

# Expression des $\alpha^E\beta_7$ -Antigens auf humanen $\gamma\delta$ T-Lymphozyten

Regulation der  $\alpha^E\beta_7$ -Expression auf humanen  $\gamma\delta$  T-Zellen  
und die Bedeutung des  $\alpha^E\beta_7$ -Phänotyps für die Zellfunktion

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

DOCTOR MEDICINAE (DR. MED.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Andreas Kämena  
geboren am 05. Mai 1975 in Goslar

**Gutachter:**

1. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. C. Kroegel
2. Prof. Dr. med. S.C. Bischoff
3. Prof. Dr. rer. nat. R. Bräuer

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.01.2005

# Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BrdU	Bromodeoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin / Rinderserumalbumin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure ('complementary desoxyribonucleic acid')
CSF	Kolonie-stimulierender Faktor ('colony-stimulating factor')
Cy5	Carbocyanin 5
DNA	Desoxyribonukleinsäure ('desoxyribonucleic acid')
dNTPs	Desoxynukleotidphosphate ('desoxynucleotidphosphates')
EDN	von Eosinophilen abgeleitetes Neurotoxin ('eosinophil derived neurotoxin')
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMAP	Endotheliale Monozyten aktivierendes Polypeptid
FCS	Fetales Kälberserum ('fetal calf serum')
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
MACS	Magnetic Cell Sorting (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ('major histocompatibility complex')
MIF	Makrophagen-Migration inhibierender Faktor ('macrophage migration inhibitory factor')
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
mRNA	Boten-RNA ('messenger RNA')
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung ('phosphate buffered saline')
PBS-FCS	PBS mit 2 % FCS
PCR	Polymerasekettenreaktion ('polymerase chain reaction')
PE	Phycoerythrin
RNA	Ribonukleinsäure ('ribonucleic acid')
RT	Reverse Transkriptase
SEM	Standardfehler des Mittelwertes ('standard error of mean')
TBE	Tris-Bor-EDTA
TCR	T-Zellrezeptor ('T cell receptor')
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor ('transforming growth factor')
TIMP	Gewebsinhibitor für Metalloproteinasen ('tissue inhibitor of metalloproteinases')
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor ('vascular endothelial growth factor')

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b><math>\gamma\delta</math> T-Lymphozyten</b>	<b>1</b>
1.1.1	Der $\alpha\beta$ und der $\gamma\delta$ T-Zellrezeptor	1
1.1.2	Bevorzugte Lokalisation der $\gamma\delta$ T-Zellen in Schleimhäuten und Epithelien	2
1.1.3	$\gamma\delta$ T-Zelluntergruppen	3
1.1.4	Antibakterielle Eigenschaften von $\gamma\delta$ T-Zellen	4
1.1.5	Zytotoxische und antitumoröse Eigenschaften von $\gamma\delta$ T-Zellen	4
1.1.6	Antivirale Eigenschaften von $\gamma\delta$ T-Zellen	5
1.1.7	Immunmodulatorische Eigenschaften von $\gamma\delta$ T-Zellen	5
<b>1.2</b>	<b>Integrin <math>\alpha^E\beta_7</math> und E-Cadherin</b>	<b>6</b>
1.2.1	Integrine	6
1.2.2	Cadherine	7
1.2.3	Funktionelle Bedeutung der Bindung von Integrin $\alpha^E\beta_7$ an E-Cadherin	8
<b>1.3</b>	<b>Expression des Integrins <math>\alpha^E\beta_7</math> auf humanen <math>\gamma\delta</math> T-Lymphozyten</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>13</b>
<b>3.1</b>	<b>Isolierung der <math>\gamma\delta</math> T-Zellen aus humanem Vollblut</b>	<b>13</b>
3.1.1	Blutentnahme	13
3.1.2	Ficoll-Paque®-Dichtezentrifugation	13
3.1.3	Magnetisches Markieren der Zellen mit dem „TCR $\gamma\delta$ MicroBead Kit“ (MACS)	14
3.1.4	Magnetische Zellseparation mit positiven Selektionssäulen (MACS)	15
3.1.5	Durchflusszytometrische Überprüfung der Reinheit	16
<b>3.2</b>	<b>Inkubation und Stimulierung der Zellen</b>	<b>16</b>
<b>3.3</b>	<b>Durchflusszytometrische Messungen</b>	<b>17</b>
3.3.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	17
3.3.2	Messung von Antigenen an der Zelloberfläche	18
<b>3.4</b>	<b>Messung der Zellproliferation mit Bromodeoxyuridin (BrdU)</b>	<b>20</b>
3.4.1	Inkubation der Zellen mit Bromodeoxyuridin	20
3.4.2	Immunfluoreszenzfärbung von Antigen an der Zelloberfläche	20
3.4.3	Zellfärbung nach dem „BrdU Flow Kit“-Protokoll	21
<b>3.5</b>	<b>Zellsortierung</b>	<b>22</b>
<b>3.6</b>	<b>Analyse der <math>\gamma\delta</math> T-Zellen der Zelllinie „Loucy“ mittels Genchips</b>	<b>23</b>
<b>3.7</b>	<b>Analyse der Genexpression mittels Polymerasekettenreaktion</b>	<b>25</b>
3.7.1	Isolierung der Gesamt-RNA	25
3.7.2	Reverse Transkription	26
3.7.3	Polymerasekettenreaktion	27
3.7.4	Gelelektrophorese	28
3.7.5	Photometrische Analyse des Gels	29
<b>3.8</b>	<b>Auswertung und Statistik</b>	<b>29</b>

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>30</b>
<b>4.1</b>	<b>Überprüfung der Methode zur Isolierung der <math>\gamma\delta</math> T-Zellen</b>	<b>30</b>
4.1.1	Quantitative Ergebnisse der Isolierung	30
4.1.2	Qualitative Ergebnisse der Isolierung	30
4.1.3	Verhältnisse der $\gamma\delta$ T-Zelluntergruppen vor und nach der Isolierung	31
4.1.4	Potentielle Beeinflussung der Ergebnisse durch die Methode der Isolierung	31
<b>4.2</b>	<b>Expression des Integrins <math>\alpha^E\beta_7</math> vor Inkubation</b>	<b>32</b>
<b>4.3</b>	<b>Analyse der Zellen nach 5 Tagen Inkubation</b>	<b>33</b>
4.3.1	Inkubation der $\gamma\delta$ T-Zellen ohne Zugabe von Stimulanzen zum Medium	33
4.3.2	Suche nach geeigneten Substanzen zur Stimulierung der $\gamma\delta$ T-Zellen	35
4.3.3	Inkubation der $\gamma\delta$ T-Zellen in Anwesenheit der Interleukine 2, 7 und 15	36
4.3.4	Inkubation der $\gamma\delta$ T-Zellen in Anwesenheit von TGF- $\beta_1$ und anti-CD3-Antikörper	38
4.3.5	Inkubation der $\gamma\delta$ T-Zellen in Anwesenheit der Interleukine 2, 7 und 15 kombiniert mit TGF- $\beta_1$ und anti-CD3-Antikörper	40
4.3.5.1	Interleukin-2 kombiniert mit TGF- $\beta_1$ und anti-CD3-Antikörper	40
4.3.5.2	Interleukin-7 kombiniert mit TGF- $\beta_1$ und anti-CD3-Antikörper	42
4.3.5.3	Interleukin-15 kombiniert mit TGF- $\beta_1$ und anti-CD3-Antikörper	43
4.3.6	Zusammenfassung der nach 5 Tagen Inkubation gemessenen Ergebnisse	45
4.3.7	Analyse der $\gamma\delta$ T-Zelluntergruppen nach 5 Tagen Inkubation	47
<b>4.4</b>	<b>Die Expression des Integrins <math>\alpha^E\beta_7</math> im Zeitverlauf</b>	<b>51</b>
<b>4.5</b>	<b>Analyse der Zellproliferation mit Bromodeoxyuridin (BrdU)</b>	<b>52</b>
4.5.1	Effekt von Zytokinen	52
4.5.2	Effekt von anti-CD103-Antikörper	54
<b>4.6</b>	<b>Analyse der Proteinbiosynthese von <math>\gamma\delta</math> T-Zellen</b>	<b>56</b>
4.6.1	Vergleich zwischen humanen $\gamma\delta$ T-Zellen und der $\gamma\delta$ T-Zelllinie „Loucy“	56
4.6.2	Genchipanalyse der $\gamma\delta$ T-Leukämiezellen	56
<b>4.7</b>	<b>Kontrolle und Validierung ausgewählter Messergebnisse mit der Polymerasekettenreaktion</b>	<b>63</b>
4.7.1	Nachweis der Synthese des Integrins $\alpha^E\beta_7$ mittels PCR	63
4.7.2	Synthese der Pankreatischen Elastase IIA in humanen $\gamma\delta$ T-Zellen	66
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>69</b>
<b>5.1</b>	<b>Der <math>\gamma\delta</math> T-Lymphozyt als Bestandteil des Immunsystems</b>	<b>69</b>
<b>5.2</b>	<b>Betrachtung der verwendeten Materialien und Methoden</b>	<b>71</b>
5.2.1	Humanes Vollblut von gesunden Probanden als Isolationsmedium	71
5.2.2	Positive magnetische Zellseparation	72
5.2.3	Inkubation der $\gamma\delta$ T-Zellen	74
<b>5.3</b>	<b><math>\gamma\delta</math> T-Zellen im Blut und im Epithel</b>	<b>74</b>
5.3.1	Zirkulation der $\gamma\delta$ T-Zellen im Blut	74
5.3.2	Transmigration der $\gamma\delta$ T-Zellen vom Blut ins Epithel	76
5.3.3	Die Eigenschaften der $\gamma\delta$ T-Zellen im Epithel	77
<b>5.4</b>	<b>Wirkung von Interleukinen auf <math>\gamma\delta</math> T-Lymphozyten</b>	<b>79</b>
5.4.1	Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen durch die Interleukine 2, 7 und 15	79
5.4.2	Interleukin-9-Rezeptor-Synthese, allergische Reaktionen und Asthma bronchiale	80
5.4.3	Synthese des Interleukin-4-Rezeptors	82

<b>5.5</b>	<b>Expression des Integrins <math>\alpha^E\beta_7</math> auf humanen <math>\gamma\delta</math> T-Lymphozyten</b>	<b>83</b>
5.5.1	Relevante Zytokine und Mediatoren	83
5.5.2	Bedeutung und Funktion der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression	89
5.5.2.1	Das Integrin $\alpha^E\beta_7$ als „Homing-Rezeptor“	89
5.5.2.2	Die $\alpha^E\beta_7$ -vermittelte Bindung der $\gamma\delta$ T-Lymphozyten an Endothelzellen im Zusammenhang mit entzündlichen Gefäßwandveränderungen	89
5.5.2.3	Das „endotheliale Monozyten aktivierende Polypeptid II“ (EMAP II)	90
5.5.2.4	Serotonin- und Substanz-P-Rezeptor-Synthese bei $\alpha^E\beta_7$ -negativen $\gamma\delta$ T-Zellen	91
5.5.2.5	Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -positive $\gamma\delta$ T-Zellen synthetisieren Pankreatische Elastase IIA	92
<b>5.6</b>	<b>Der <math>\gamma\delta</math> T-Lymphozyt als protektive antimikrobielle Immunzelle</b>	<b>93</b>
<b>5.7</b>	<b>Pathogenetisches Modell der Lungengewebsschädigung durch <math>\gamma\delta</math> T-Lymphozyten</b>	<b>95</b>
<b>5.8</b>	<b>Anwendung &amp; Ausblick</b>	<b>96</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>98</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	<b>100</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>110</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 $\gamma\delta$ T-Lymphozyten

### 1.1.1 Der $\alpha\beta$ und der $\gamma\delta$ T-Zellrezeptor

T-Lymphozyten sind durch den T-Zellrezeptor auf ihrer Zelloberfläche charakterisiert. Der T-Zellrezeptor ist ein Heterodimer, der sich aus zwei Ketten zusammensetzt. Bei den meisten T-Zellen im Blut besteht dieser Rezeptor aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette. Jede dieser Ketten wird von einem Gen codiert, welches sich aus den Gen-Segmenten V, D, J und C zusammensetzt. Wie beim B-Zellrezeptor gibt es verschiedene in Clustern angeordnete Varianten dieser Gen-Segmente (Tonegawa, 1983). Die Gen-Segmente der  $\alpha$ -Kette liegen auf dem Chromosom 14 und die der  $\beta$ -Kette auf dem Chromosom 7. Durch unterschiedliche Kombination dieser Gen-Segmente miteinander ergibt sich rechnerisch ein potentielles Repertoire von  $1,3 \times 10^{10}$   $\alpha\beta$  T-Zellrezeptor-Varianten. Die tatsächlich gemessene Zahl an  $\alpha\beta$  T-Zellrezeptor-Varianten im menschlichen Körper liegt bei etwa  $2,5 \times 10^7$ .

Nicht bei allen T-Zellen besteht der T-Zellrezeptor aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette. Es gibt eine zweite Gruppe von T-Zellen, bei denen sich der T-Zellrezeptor aus einer  $\gamma$ - und einer  $\delta$ -Kette zusammensetzt. Das T-Zellrezeptor-Repertoire dieser  $\gamma\delta$  T-Zellen scheint aufgrund der eingeschränkten Gen-Segment-Vielfalt sehr viel geringer als das der  $\alpha\beta$  T-Zellen zu sein (Kobayashi et al., 1991; Pawankar, 2000). Die Gen-Segmente der  $\gamma$ -Kette liegen auf dem Chromosom 7 und die der  $\delta$ -Kette auf dem Chromosom 14 im Cluster der  $\alpha$ -Kette (Strauss et al., 1987; Huck et al., 1988). Es konnten unterschiedliche Gruppen von  $V\gamma$ - und  $V\delta$ -Ketten identifiziert werden, die es erlauben, die  $\gamma\delta$  T-Zellen in entsprechende Untergruppen einzuteilen. Ebenso wie bei den  $\alpha\beta$  T-Zellen ist auch bei den  $\gamma\delta$  T-Zellen der T-Zellrezeptor mit dem Oberflächenantigen CD3 assoziiert (Kabelitz, 1993). Die  $\gamma\delta$  T-Zellen besitzen ebenfalls wie die  $\alpha\beta$  T-Zellen die Zelloberflächenproteine CD2, CD5, CD7, CD11b, CD16, CD25, CD28 und CD45 (Haas et al., 1993).

Im Gegensatz zu reifen  $\alpha\beta$  T-Zellen exprimiert die Mehrheit der  $\gamma\delta$  T-Zellen jedoch weder CD4 noch CD8. Das Antigen CD8 kann bei einer kleinen Untergruppe der  $\gamma\delta$  T-Zellen nachgewiesen werden (Lanier et al., 1986; Moretta et al., 1988; Groh et al., 1989; Scott et al.,

1990), das Antigen CD4 wird jedoch nur von sehr wenigen  $\gamma\delta$  T-Zellen exprimiert (Morita et al., 1991; Spits et al., 1991). Auf  $\alpha\beta$  T-Zellen fungieren die Antigene CD8 und CD4 als Korezeptoren. Gemeinsam mit dem T-Zellrezeptor können mit Hilfe dieser Antigene, welche an sog. MHC-Klasse-I- bzw. MHC-Klasse-II-Moleküle spezifisch binden, antigen-präsentierende Zellen und infizierte körpereigene Zellen erkannt werden (Porcelli et al., 1991; Kabelitz, 1992). Diese Fähigkeit, welche für die Immunreaktion von  $\alpha\beta$  T-Zellen von entscheidender Bedeutung ist, besitzen  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten offensichtlich nicht; zumindest wird bei  $\gamma\delta$  T-Zellen ihre Immunreaktion nicht durch die Antigene CD8 und CD4 determiniert. Dieses wurde durch Versuche bestätigt, bei denen die  $\gamma\delta$  T-Zellen im Gegensatz zu  $\alpha\beta$  T-Zellen nach Blockierung der MHC-Moleküle mit Antikörpern in ihrer Reaktivität nicht beeinträchtigt waren (Haas et al., 1993). Falls die  $\gamma\delta$  T-Zellen die Fähigkeit besitzen, mit ihrem T-Zellrezeptor Antigene spezifisch zu erkennen, ist die Zahl der unterschiedlichen Antigene, auf die ein  $\gamma\delta$  T-Zellklon spezifisch reagieren könnte, durch die im Vergleich zu  $\alpha\beta$  T-Zellen sehr beschränkte Variabilität des T-Zellrezeptors limitiert. T-Lymphozytentypische Selektions- und Reifungsprozesse im Thymus werden, zumindest für einige  $\gamma\delta$  T-Zelluntergruppen, angenommen (Asarnow et al., 1988; Havran & Allison, 1990; Ikuta et al., 1990). Obwohl in neueren Studien sogenannte nicht-klassische MHC-Moleküle für  $\gamma\delta$  T-Zellen diskutiert werden (Steele et al., 2000; Wingren et al., 2000), muss davon ausgegangen werden, dass sich die Funktion der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten im Immunsystem grundlegend von derjenigen der  $\alpha\beta$  T-Lymphozyten unterscheidet.

### **1.1.2 Bevorzugte Lokalisation der $\gamma\delta$ T-Zellen in Schleimhäuten und Epithelien**

Aufgrund ihrer bevorzugten Lokalisation in Schleimhäuten und Epithelien, wo sie im intraepithelialen und subepithelialen Bindegewebe verstärkt nachgewiesen werden können, wird den  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten eine „first line“ Abwehrfunktion zugeschrieben. Verglichen mit dem relativ geringen Anteil von etwa 5 % an der Lymphozytengesamtpopulation im menschlichen Blut und in den lymphatischen Organen kann der Anteil der  $\gamma\delta$  T-Zellen in den Schleimhäuten auf ein Vielfaches ansteigen (Haas et al., 1993; Ziora et al., 1999). Im oberen Respirationstrakt im Bereich der Tonsillen exprimierten bis zu 30 % der T-Lymphozyten den  $\gamma\delta$  T-Zellrezeptor (Graeme-Cook et al., 1993). In der Mukosa des Nasopharynx (Takeuchi et al., 1997; Hirata et al., 2000), des Intestinaltraktes (Nakamura et al., 1999; Boismenu, 2000; Islam & Christensson, 2000; Kanazawa et al., 2001) der Harnblase (Christmas, 1994; Jones-



Carson et al., 1999) und der Vagina (Rakasz et al., 1999) wurden  $\gamma\delta$  T-Zellen im Zusammenhang sowohl mit chronischen Entzündungen ungeklärter Ätiologie als auch mit bakteriellen und viralen Infektionen beobachtet. In der Haut korrelierte die  $\gamma\delta$  T-Zellzahl mit der Aktivität des systemischen Lupus erythematoses (Robak et al., 2001), was auf eine Beteiligung auch an autoimmunen Prozessen hinweist. Ebenso wird angenommen, dass  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten eine Rolle bei allergischen Reaktionen (Pawankar, 2000; Villarrubia et al., 2002) und beim Asthma bronchiale spielen (Holt & Sly, 1999; Bai et al., 2001).

### **1.1.3 $\gamma\delta$ T-Zelluntergruppen**

Je nach Gewebe und Lokalisation kann sich das Verhältnis der einzelnen  $\gamma\delta$  T-Zelluntergruppen zueinander verschieben.  $V\delta 1^+$  Zellen werden beispielsweise bevorzugt im Thymus und weniger im menschlichen Blut gefunden, wo ihr Anteil mit dem Alter abnimmt. Dagegen bilden  $V\delta 2^+$  und  $V\gamma 9^+$  Zellen nach der Geburt den quantitativ größten Anteil der  $\gamma\delta$  T-Zellen im menschlichen Blut von bis zu 90 % (Haas et al., 1993). Inwieweit sich die  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten je nach Untergruppe und „Heimatgewebe“ in ihrer biologischen Funktion voneinander unterscheiden, ist bisher nicht bekannt. Es wird vermutet, dass die verschiedenen Untergruppen auf unterschiedliche Arten von Antigenen reagieren und von bestimmten Antigentypen gruppenspezifisch stimuliert werden können.

Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen auf abgetötete Mykobakterien in Anwesenheit von antigenpräsentierenden Zellen proliferieren (Augustin et al., 1989; Janis et al., 1989; Havlir et al., 1991). Für diese Reaktion war keine Interaktion mit klassischen MHC-Molekülen notwendig, da die Proliferation der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten nicht durch die Blockierung der MHC-Moleküle mit spezifischen Antikörpern beeinträchtigt wurde. Die präsentierten mykobakteriellen Antigene wurden mittels  $\gamma\delta$  T-Zellrezeptor erkannt, da nach Blockierung des  $\gamma\delta$  T-Zellrezeptors mit spezifischen Antikörpern sich die  $\gamma\delta$  T-Zellen nicht mehr durch die Mykobakterien-Antigene stimulieren ließen (O'Brien et al., 1989; Wilde et al., 1992). Bei Analyse der verschiedenen Mykobakterien-Antigene wurde festgestellt, dass einige  $\gamma\delta$  T-Zellen speziell auf das mykobakterielle Hitze-Schock-Protein Hsp65 reagierten. Es stellte sich heraus, dass die Zellen dieser Untergruppe durch die T-Zellrezeptorketten  $V\gamma 1$  und  $V\delta 6$  charakterisiert waren (Happ et al., 1989; O'Brien et al., 1992), wohingegen die  $\gamma\delta$  T-Zellen, welche auf die übrigen Mykobakterien-Antigene reagierten, die Rezeptorketten

V $\gamma$ 9 und V $\delta$ 2 aufwiesen (Kabelitz et al., 1991; Panchamoorthy et al., 1991). Die Untergruppen der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten unterscheiden sich demnach in ihrer Spezifität für gewisse Superantigene. Die molekulare Struktur dieser putativen Superantigene für  $\gamma\delta$  T-Zellen und ihre Interaktion mit den  $\gamma\delta$  T-Zellen ist bisher nicht geklärt.

#### **1.1.4 Antibakterielle Eigenschaften von $\gamma\delta$ T-Zellen**

Die Rolle von  $\gamma\delta$  T-Zellen im Zusammenhang mit Tuberkulose und anderen granulomatösen Entzündungen wie Sarkoidose wurde untersucht. Es stellte sich heraus, dass die  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten zwar im Randbereich der Granulome verstärkt vorkommen, die Granulombildung aber nicht direkt von ihnen abhängt (Kim et al., 1996). An knockout-Mäusen, die nicht in der Lage waren  $\gamma\delta$  T-Zellen zu produzieren, waren  $\gamma\delta$  T-Zellen zur Abwehr der Mykobakterien nicht notwendig (Kaufmann & Ladel, 1994; D'Souza et al., 1997). Die Immunreaktion von  $\gamma\delta$  T-Zell-knockout-Mäusen nach Infektion mit Mykobakterien war jedoch weniger effektiv, und bei höheren Bakterien-Konzentrationen starben die Mäuse mit dem  $\gamma\delta$  T-Zelldefekt im Gegensatz zu denen der Kontrollgruppe (Ladel et al., 1995; Saunders et al., 1998). In der bronchoalveolären Lavage bei Patienten mit Tuberkulose und Sarkoidose konnte nur in einigen Studien eine signifikant erhöhte  $\gamma\delta$  T-Zellkonzentration nachgewiesen werden (Raulf et al., 1994; Utsumi et al., 1995; Wilsher et al., 1996; Uh et al., 1998; Ziora et al., 1999).

#### **1.1.5 Zytotoxische und antitumoröse Eigenschaften von $\gamma\delta$ T-Zellen**

Die  $\gamma\delta$  T-Zellen scheinen durch ihre Zytokin-Expression (Munk & Emoto, 1995; Boismenu et al., 1996) eine wichtige immunmodulatorische und ggf. auch eine unterstützende zytotoxische Funktion zu besitzen. Ähnliches wird auch für die Bekämpfung von Tumorzellen angenommen (Suzuki et al., 1999; Kobayashi et al., 2001). *In vitro* wurden zytotoxische Eigenschaften von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten gegenüber Tumorzelllinien nachgewiesen. Im Tierversuch konnte durch Infusion von  $\gamma\delta$  T-Zellen das Wachstum eines Tumors, auf den die  $\gamma\delta$  T-Zellen *in vitro* zytotoxisch wirkten, zeitweise gestoppt werden (Zheng et al., 2001). Besonders bei Tumoren, die sich durch Down-Regulation der MHC-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche der Erkennung durch CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T-Zellen entziehen, könnten die  $\gamma\delta$  T-Zellen eine wichtige Rolle spielen (Ferrarini et al., 2002).

### **1.1.6 Antivirale Eigenschaften von $\gamma\delta$ T-Zellen**

Einigen neueren Untersuchungen zufolge sind  $\gamma\delta$  T-Zellen auch an antiviralen Immunreaktionen bei Infektionen mit RNA- und DNA-Viren beteiligt. Durch Infektionen mit Humanem Immundefizienz-Virus (HIV), Herpes-Simplex-Virus-1 (HSV-1), Influenza-Virus, Sendai-Virus (SeV / Parainfluenza-1-Virus), Coxsackie-Virus (CSV), Vaccinia-Virus (VV), Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV) und Cytomegalie-Virus (CMV) werden  $\gamma\delta$  T-Zellen aktiviert und akkumulieren am Ort der Virus-Replikation (Sciammas & Bluestone, 1999). Es konnten Virus-Antigene nachgewiesen werden, die von den  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten erkannt werden. Schließlich wurde gezeigt, dass die  $\gamma\delta$  T-Zellen eine Schutzfunktion gegen virale Infektionen erfüllen (Agostini et al., 1994; Sciammas & Bluestone, 1999; Lafarge et al., 2001).

### **1.1.7 Immunmodulatorische Eigenschaften von $\gamma\delta$ T-Zellen**

In den letzten Jahren wurden ständig neue Bereiche des Immunsystems mit Entzündungsreaktionen entdeckt, an denen  $\gamma\delta$  T-Zellen beteiligt sind. Neben zytotoxischen Eigenschaften mit der Fähigkeit zur direkten Zelllyse durch Expression von Perforin und Serin-Esterasen 1 und 2 (Nakata et al., 1990; Koizumi et al., 1991) besitzen  $\gamma\delta$  T-Zellen auch immunmodulatorische Eigenschaften, wie in einigen Arbeiten gezeigt werden konnte.

Bei Patienten mit Zustand nach Herztransplantation wurde in den endomyocardialen Biopsien ein Jahr nach Transplantation ein erhöhter  $\gamma\delta$  T-Lymphozytenanteil von etwa 30 % an der Lymphozyten-Gesamtpopulation nachgewiesen, wohingegen frühere Biopsien weniger  $\gamma\delta$  T-Zellen enthielten (Vaessen et al., 1991). Die aus den Biopsien gewonnenen  $\gamma\delta$  T-Zellen waren nicht spezifisch für die Transplantatzellen. Es wurde eine immunmodulatorische, auf die Abstoßungsreaktion dämpfend wirkende Funktion der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten vermutet. Eine solche immunmodulatorische Eigenschaft der  $\gamma\delta$  T-Zellen konnte später im Tierversuch bei der Untersuchung von Kornea-Transplantaten bestätigt werden. Das Kammerwasser der vorderen Augenkammer ist mit dem besonderen Privileg ausgestattet, Immunreaktionen vom Spättyp (Typ IV) und Abstoßungsreaktionen selektiv zu unterdrücken. Diesen Vorgang bezeichnet man als 'anterior chamber-associated immune deviation' (ACAID). Das ACAID-Phänomen dient wahrscheinlich der Erhaltung der Integrität empfindlicher Strukturen bei intraokularen Entzündungen. Andere immunologische Reaktionen, beispielsweise die

Induktion von Antikörpern, verlaufen dagegen ungestört. Mäuse, bei denen die  $\gamma\delta$  T-Zellen in der vorderen Augenkammer durch anti- $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor-Antikörper blockiert wurden, waren nicht mehr in der Lage, das ACAID zu entwickeln. Sie zeigten ebenso wie  $\gamma\delta$  T-Zell-knockout-Mäuse eine heftige Immunreaktion gegen injizierte Alloantigene. Die Abstoßungsreaktion von Kornea-Transplantaten war signifikant erhöht (Skelsey et al., 2001).

Ähnliche regulative Eigenschaften werden den  $\gamma\delta$  T-Zellen bei allergischen Immunreaktionen (Jahnsen et al., 1998) und bei Asthma bronchiale zugeschrieben (Holt & Sly, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten durch ihre Zytokinproduktion auch an der Wundheilung beteiligt sind (Jameson et al., 2002). Ihre Aufgaben im Immunsystem sind vielfältig und ihre Funktionen scheinen von dem jeweiligen Gewebe, der vorhandenen Antigen-Struktur und dem lokalen Mikromilieu abzuhängen (Carding & Egan, 2002; Chen & Letvin, 2003). Bisher ist es allerdings noch nicht gelungen, das Zusammenspiel der  $\gamma\delta$  T-Zellen mit anderen Immunzellen und ihre Rolle in immunologischen Prozessen im Detail zu entschlüsseln.

Die vorwiegend intraepitheliale Lokalisation der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten wirft die Frage auf, welche Faktoren den Aufenthaltsort von  $\gamma\delta$  T-Zellen bestimmen und inwieweit dadurch die  $\gamma\delta$  T-Zellen in ihrer Funktion beeinflusst werden. Hier könnte wie auch bei anderen intraepithelialen Lymphozyten (IEL) das Integrin  $\alpha^E\beta_7$ , welches an das epitheliale E-Cadherin bindet, eine wichtige Rolle spielen und als sog. „Homing-Rezeptor“ bei der Akkumulation im Epithelgewebe fungieren.

## **1.2 Integrin $\alpha^E\beta_7$ und E-Cadherin**

### **1.2.1 Integrine**

Integrine bilden eine Familie von transmembranen Adhäsionsmolekülen, die sowohl an Zell-Zell- als auch an Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt sind. Die heterodimerischen Integrine setzen sich aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette zusammen. Es sind mindestens 15  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Ketten bekannt, die miteinander kombiniert eine große Zahl von unterschiedlichen Integrinen bilden (Higgins et al., 1998). Aufgrund gemeinsamer  $\beta$ -Ketten verschiedener Integrine lassen sich Unterfamilien definieren (Hynes, 1992). Drei solcher Unterfamilien, die

$\beta_1$ -,  $\beta_2$ - und  $\beta_3$ -Integrine, werden üblicherweise auf Leukozyten gefunden. Die Expression von  $\beta_1$ -Integrinen ist weitverbreitet. Das Integrin  $\alpha_5\beta_1$  (CD49e/CD29) wird z. B. auf T-Zellen, Granulozyten, Thrombozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und Epithelzellen gefunden. Dagegen ist die Expression von  $\beta_2$ - und  $\beta_7$ -Integrinen auf bestimmte Zellen beschränkt. Das Integrin  $\alpha^L\beta_2$  (CD11a/CD18) wird z. B. von den meisten Lymphozyten und vielen myeloiden Zellen, aber nicht von anderen Zellen exprimiert (Higgins et al., 1998). Das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  (CD103/unclustered) wird auf über 95 % der intestinalen intraepithelialen Lymphozyten und auf anderen mukoiden T-Zellen gefunden, aber nur auf 2 % der im Blut zirkulierenden Lymphozyten (Cerf-Bensussan et al., 1987; Smith et al., 1994; Tiisala et al., 1995).

Die Kette  $\alpha^E$  ist bisher nur in Kombination mit der Kette  $\beta_7$  nachgewiesen worden. Damit kann bei Nachweis von CD103, welches der  $\alpha^E$ -Kette entspricht, die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  angenommen werden. Dieses für humane intraepitheliale Lymphozyten (IEL) typische Integrin bindet an das epitheliale Adhäsionsmolekül E-Cadherin an der basolateralen Seite der Epithelzellen (Cepek et al., 1993; Cepek et al., 1994; Karecla et al., 1995). Es wird vermutet, dass E-Cadherin ein homophiles Adhäsionsmolekül ist, welches aufgrund seiner Sequenz keine Verwandtschaft mit anderen bekannten Zelloberflächen- oder extrazellulären Integrin-Liganden besitzt (Takeichi, 1995). Mit monoklonalen Antikörpern gegen E-Cadherin oder gegen das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  konnte die Adhäsion von IEL an epitheliale Zellen blockiert werden. Eine Transfektion von Zellen mit dem  $\alpha^E\beta_7$ -Antigen verleiht Zellen hingegen die Fähigkeit, an mit E-Cadherin transfizierte Zellen zu binden (Cepek et al., 1994). Die direkte physikalische Interaktion von Integrin  $\alpha^E\beta_7$  und E-Cadherin mit Bindung an die N-terminale Domäne von E-Cadherin konnte auf molekularer Ebene verifiziert werden (Karecla et al., 1996; Higgins et al., 1998; Taraszka et al., 2000; Corps et al., 2001).

### 1.2.2 Cadherine

Von den Zelloberflächen-Adhäsionsmolekülen, den Cadherinen, ist bekannt, dass sie eine bestimmte Gewebsverteilung besitzen und ihre Expression jeweils auf gewisse Zellarten beschränkt ist (Nose & Takeichi, 1986; Shimoyama et al., 1989; Takeichi, 1990). N-Cadherin wird z. B. hauptsächlich auf neuronalen Zellen (Hatta et al., 1987), VE-Cadherin auf vaskulären Endothelzellen (Lampugnani et al., 1992), und E-Cadherin wird typischerweise auf reifen Epithelzellen gefunden (Boller et al., 1985; Gumbiner et al., 1988; Tang et al., 1993). Daher wird angenommen, dass die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  auf Lymphozyten eine zentrale

Rolle für den Aufenthalt von Lymphozyten in Schleimhäuten (Parker et al., 1992) und anderen epithelialen Geweben spielt.

Neben E-Cadherin wurde ein weiteres Adhäsionsmolekül für das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  entdeckt, das Lymphozyten-Endotheliale-Epitheliale-Zelladhäsionsmolekül (LEEP-CAM) (Agace et al., 2000). Des Weiteren wurde beobachtet, dass Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierende Lymphozyten über eine E-Cadherin-unabhängige Interaktion an vaskuläre Endothelzellen binden (Strauch et al., 2001). Das Lymphozyten-Endotheliale-Epitheliale-Zelladhäsionsmolekül könnte hier als Bindungspartner für das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  fungieren.

### **1.2.3 Funktionelle Bedeutung der Bindung von Integrin $\alpha^E\beta_7$ an E-Cadherin**

Es konnte gezeigt werden, dass  $\alpha^E$ -knockout-Mäuse, welche das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  nicht synthetisieren können, eine deutlich geringere Anzahl von IEL aufwiesen (Higgins et al., 1998; Schon et al., 1999). Einerseits scheint die gewebspezifische Lokalisation der Lymphozyten von der Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  abzuhängen, weshalb das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  auch als „Homing-Rezeptor“ bezeichnet wird (Brown et al., 1999; Pauls et al., 2001). Andererseits deuten einige Beobachtungen darauf hin, dass mit der Integrin-Expression die T-Lymphozyten auch in ihrer immunologischen Funktion beeinflusst werden.

Bei Störung der normalen Gewebearchitektur durch Verlust der E-Cadherin-Funktion wurde eine erhöhte Tendenz zur Invasion und Metastasierung bei verschiedenen Karzinomen beobachtet (Terpe et al., 1993; Ben Ze'ev, 1997; Joo et al., 2002). Hier, wie auch bei der host-versus-graft-Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantation (Hadley et al., 1997; Rostapshova et al., 1998; Robertson et al., 2001a; Robertson et al., 2001b) scheinen zytotoxische T-Lymphozyten im Vordergrund zu stehen, welche das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimieren. Bei chronischen Entzündungen wie z. B. der chronischen Pankreatitis (Ebert et al., 1998) oder dem Sjögren-Syndrom (Kroneld et al., 1998; Fujihara et al., 1999) wurde ebenfalls ein erhöhter Anteil von Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierenden T-Lymphozyten im entzündeten Gewebe nachgewiesen.

Im Zusammenhang mit chronischen Entzündungen ist die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  auf alveolären T-Lymphozyten bei interstitiellen Lungenerkrankungen und pulmonalen Fibrosen besonders interessant. Obwohl bis heute unklar ist, welche Rolle Entzündungszellen bei der

Idiopathischen Pulmonalen Fibrose spielen (Gauldie, 2002; Strieter, 2002), scheint eine signifikant erhöhte Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  auf den alveolaren T-Lymphozyten bei Patienten mit Idiopathischer Pulmonaler Fibrose zumindest auf eine Beteiligung der T-Lymphozyten hinzudeuten. Ähnliches gilt auch für die Hypersensitivitäts-Pneumonitis und die Sarkoidose im Stadium II und III (Lohmeyer et al., 1999; Braun et al., 2000). Bei Patienten mit Sarkoidose im Stadium I hingegen wurden erniedrigte Werte der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression in der bronchoalveolären Lavage gemessen (Lohmeyer et al., 1999; Kolopp-Sarda et al., 2000). Inwieweit die Messung dieser Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression bei entzündlichen Erkrankungen diagnostisch bzw. eine mögliche Beeinflussung dieser Expression ggf. auch therapeutisch eingesetzt werden kann, bleibt abzuwarten.

### **1.3 Expression des Integrins $\alpha^E\beta_7$ auf humanen $\gamma\delta$ T-Lymphozyten**

Ob es sich in den bisher veröffentlichten Untersuchungen, bei denen das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  auf T-Lymphozyten nachgewiesen wurde, um  $\gamma\delta$  T-Zellen gehandelt hat, wurde bisher nicht untersucht. Da es sich bei den  $\gamma\delta$  T-Zellen um Lymphozyten mit vorwiegend intraepithelialer Lokalisation handelt, wäre eine Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  mit Adhäsion an Epithelzellen via E-Cadherin fast eine logische Konsequenz. Bei über 100 Patienten mit Bronchial-Karzinomen, Pneumonien, Bronchitiden und verschiedenen fibrosierenden Lungenerkrankungen wurde die bronchoalveoläre Lavage durchflusszytometrisch analysiert (Kroegel et al., unveröffentlicht). Es wurde festgestellt, dass lavagierte humane  $\gamma\delta$  T-Zellen die Fähigkeit besitzen, das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  zu exprimieren. Der Anteil der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten, welche das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierten, variierte je nach Patient und Krankheitsbild zwischen 5 % und 95 %. Dabei fiel auf, dass bei Patienten mit fibrosierenden Lungenerkrankungen, wie z. B. Pneumokoniosen, ein besonders hoher Anteil an  $\alpha^E\beta_7$ -positiven  $\gamma\delta$  T-Zellen zu finden war, wohingegen bei Patienten mit akuten Pneumonien geringere Anteile gemessen wurden.

Es zeigte sich, dass die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  für  $\alpha\beta$  T-Lymphozyten und  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten differenziert betrachtet werden muss. Der emphysematische Umbau der Lunge im Rahmen einer COPD (chronische obstruktive Lungenerkrankung) scheint beispielsweise besonders von dem Anteil an Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierenden  $CD4^+$   $\alpha\beta$  T-Zellen abzuhängen (Ferchland et al., 2001). Bei pulmonalen Fibrosen hingegen spielen offensichtlich

$\gamma\delta$  T-Zellen, welche das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimieren, eine Rolle. Im Tierversuch konnte in der BAL von Mäusen, bei denen eine Lungenfibrose durch Instillation von Bleomycin ausgelöst wurde, bei über 80 % der  $\gamma\delta$  T-Zellen eine zwei- bis dreifach höhere Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  nachgewiesen werden als auf  $CD4^+$  und  $CD8^+$   $\alpha\beta$  T-Zellen (Braun et al., 1996).

Die derzeit zur Verfügung stehenden Daten legen eine Beteiligung von  $\gamma\delta$  T-Zellen an der Pathogenese von pulmonalen Fibrosen nahe. Welche Rolle die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  hierbei spielt, ist jedoch nach wie vor unklar. Wodurch  $\gamma\delta$  T-Zellen veranlasst werden, das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  zu exprimieren, und inwieweit dies die Eigenschaften der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten in ihrer möglicherweise zytotoxischen oder immunmodulatorischen Funktion verändert, ist ebenfalls nicht bekannt.



## 2 Zielsetzung der Arbeit

Neueren Untersuchungen zufolge spielen  $\alpha^E\beta_7$ -exprimierende Lymphozyten möglicherweise eine Rolle bei der Pathogenese chronisch-fibrosierender Entzündungen mit narbigem Umbau von Gewebe. Im Mausmodell konnte auf den bronchoalveolär lavagierten  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten bei bleomycin-induzierter Lungenfibrose eine deutlich erhöhte Expression des  $\alpha^E\beta_7$ -Antigens nachgewiesen werden (Braun et al., 1996). Die bisher noch unveröffentlichten Ergebnisse von Kroegel et al. deuten darauf hin, dass auch beim Menschen die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  auf  $\gamma\delta$  T-Zellen eine Rolle bei der Pathogenese von fibrosierenden Lungenerkrankungen spielen könnte. Allerdings ist über die Zellbiologie von  $\alpha^E\beta_7$ - $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten bisher nichts bekannt. Auch die für die Expression verantwortlichen Mediatoren und Zytokine wurden bislang nicht untersucht.

1. Es stellt sich die Frage, in Anwesenheit welcher Zytokine oder Stimulanzen  $\gamma\delta$  T-Zellen das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimieren. Humane  $\gamma\delta$  T-Zellen von gesunden Spenderinnen und Spendern sollen nach Isolierung aus dem venösen Vollblut dahingehend analysiert werden.
2. Nach Ermittlung der optimalen Stimulationsbedingungen soll die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  im Zeitverlauf untersucht werden. Folgende Fragen sind in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse: Nach welcher Zeitspanne ist bei entsprechender Stimulation die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  maximal, und wie groß ist dann der Anteil an  $\gamma\delta$  T-Zellen, die das  $\alpha^E\beta_7$ -Antigen exprimieren? Lässt sich durch geeignete Stimulation *in vitro* ein der In-vivo-Expansion vergleichbarer Anteil an  $\alpha^E\beta_7$ -positiven  $\gamma\delta$  T-Zellen erreichen, ließen sich hieraus Rückschlüsse auf das entzündliche alveoläre Mikromilieu und damit auch auf die Pathogenese fibrotischer Lungenerkrankungen ziehen.
3. Des Weiteren soll auch untersucht werden, ob sich einige dieser  $\gamma\delta$  T-Zelluntergruppen bezüglich der Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  in Anwesenheit verschiedener Stimulanzen voneinander unterscheiden.

4. Es ist bekannt, dass  $\alpha^E\beta_7$  exprimierende T-Lymphozyten über das Adhäsionsmolekül E-Cadherin an Epithelzellen binden können. Ob in Zusammenhang mit dieser Zell-Zell-Interaktion  $\gamma\delta$  T-Zellen ihre funktionellen Eigenschaften mit entsprechender Adaptation des Proteinbiosynthesemusters ändern, ist nicht bekannt. Welche Zytokine und Rezeptoren exprimieren  $\alpha^E\beta_7$ -positive und  $\alpha^E\beta_7$ -negative  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten? Lassen sich hieraus Hinweise auf das Zusammenspiel der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten mit anderen Entzündungszellen ableiten?
5. Die Charakterisierung der Zellen soll ferner dazu beitragen, die Rolle der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten im Rahmen des Immunsystems besser zu verstehen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 *Isolierung der $\gamma\delta$ T-Zellen aus humanem Vollblut*

#### 3.1.1 Blutentnahme

Die  $\gamma\delta$  T-Zellen wurden ausschließlich aus dem Blut von gesunden Spenderinnen und Spendern gewonnen. Zur Isolierung wurden 108 ml venöses Vollblut mit 12 EDTA-Röhrchen (1,6 mg EDTA / ml Blut) aus einer peripheren Unterarmvene entnommen.

Alle Schritte der Isolierung bis zur Inkubation und Stimulation der isolierten Zellen im Inkubator wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank (HERA Safe Sterilbank, Heraeus Instruments, Gera) durchgeführt.

#### 3.1.2 Ficoll-Paque®-Dichtezentrifugation

Die 108 ml EDTA-Blut wurden mit 92 ml PBS (Dulbecco's PBS, Cell Concepts, Umkirch, Deutschland) auf insgesamt 200 ml verdünnt. In acht 50-ml-Röhrchen wurden auf je 20 ml Ficoll-Paque® 25 ml des verdünnten EDTA-Blutes geschichtet. Durch die anschließende Dichtezentrifugation mit 400 g über 30 Minuten bei 20 °C wurden die mononukleären Zellen von den Granulozyten, Erythrozyten und Thrombozyten, die sich durch ihr höheres spezifisches Gewicht als Pellet absetzten, getrennt. Die mononukleären Zellen, Lymphozyten und Monozyten, setzten sich an der Grenzschicht zwischen Serum und Ficoll-Paque® als trübe weißliche Schicht ab.

Die mononukleären Zellen wurden direkt an der Grenzschicht abgenommen und nach zweimaligem Waschen (PBS, 300 g, 10 min, 4 °C) in einem 50-ml-Röhrchen zusammengeführt. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen und gekühlt gehalten. Die Zellzahl der mononukleären Zellen wurde nach Kimura-Färbung durch Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

**3.1.3 Magnetisches Markieren der Zellen mit dem „TCR  $\gamma\delta$  MicroBead Kit“ (MACS)**

Grundlage für das Verfahren zur Isolierung der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten aus einer Zellsuspension von mononukleären Zellen war die von Miltenyi et al. (1990) entwickelte Methode der immunmagnetischen Separation. Bei der Isolierung der  $\gamma\delta$  T-Zellen handelte es sich um eine positive Selektion, d. h. die zu isolierenden Zellen werden durch Antikörper markiert. Der bei der Markierung verwendete „TCR  $\gamma\delta$  Hapten-Antibody“ aus dem „TCR  $\gamma\delta$  MicroBead Kit“ (MACS) bindet laut Herstellerangaben an die verschiedenen Untergruppen der  $\gamma\delta$  T-Zellen mit gleicher Affinität. Das im Vollblut vorhandene Verhältnis der  $\gamma\delta$  T-Zelluntergruppen zueinander ändert sich demnach durch die Isolierung nicht.

Für den Markierungs- und den anschließenden magnetischen Isolierungsvorgang wurde als Puffer ausschließlich PBS mit 0,5 % BSA (Sigma Aldrich Chemie, Steinbach, Deutschland) und 2 mM EDTA (Sigma Aldrich Chemie, Steinbach, Deutschland) verwendet.

Die mononukleären Zellen wurden in ein 2-ml-Röhrchen überführt, mit 300 g über 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und das Pellet in 40  $\mu$ l Puffer je  $1 \times 10^7$  Zellen aufgenommen. Im ersten Inkubationsschritt wurden 10  $\mu$ l „TCR  $\gamma\delta$  Hapten-Antibody“ je  $1 \times 10^7$  Zellen gegeben und für 10 Minuten bei 8 °C inkubiert.

Für den zweiten Inkubationsschritt wurden weitere 30  $\mu$ l Puffer je  $1 \times 10^7$  Zellen mit 20  $\mu$ l „Anti-Hapten MicroBeads-FITC“ (MACS) je  $1 \times 10^7$  Zellen hinzugegeben und für 15 Minuten bei 8 °C inkubiert. Um eine optimale und gleichmäßige Inkubation aller Zellen zu erreichen, wurden die Zellen bei beiden Vorgängen motorgetrieben langsam geschwenkt.

Anschließend wurden die Zellen zum Waschen in ein 50-ml-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde durch Auffüllen des Röhrchens mit Puffer auf das 20- bis 30-fache verdünnt, und die Zellen mit 300 g über 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 500  $\mu$ l Puffer je  $10^8$  Zellen aufgenommen und gekühlt gehalten.

### 3.1.4 Magnetische Zellseparation mit positiven Selektionssäulen (MACS)

Zur magnetischen Zellisolierung der markierten  $\gamma\delta$  T-Zellen wurden positive Selektionssäulen vom Typ  $LS^+/VS^+$  des MidiMACS-Systems (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) benutzt. Bei diesem System wurden die zu isolierenden markierten Zellen in der Säule zurückgehalten, solange diese sich in einem starken Magnetfeld befand. Nach dem Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld konnten die zurückgehaltenen Zellen dann mit einer Pufferlösung herausgespült werden. Die Reinheit der isolierten Zellen konnte anschließend durchflusszytometrisch bestimmt werden, da die zur Isolierung verwendeten magnetischen Beads mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC markiert waren und somit die positiven Zellen abgegrenzt werden konnten.

Die Selektionssäule wurde in den Magneten des MidiMACS-Systems eingesetzt und mit einem 30- $\mu$ m-Filter (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) versehen. Filter und Säule wurden mit 3 ml Puffer vorgewaschen. Danach wurde die Zellsuspension auf den Filter gegeben. Die negativen Zellen passierten die Säule mit dem Puffer, die positiven Zellen wurden in der Säule zurückgehalten. Nach Durchlauf der Zellsuspension wurde die Säule dreimal mit je 3 ml Puffer nachgespült. Um die positiven Zellen aus der Säule zu extrahieren, wurde das Reservoir (ca. 5 ml) über der Säule mit Puffer aufgefüllt, die Säule aus dem Magnetfeld genommen und der Puffer mit einem Stempel zügig durch die Säule in ein 50-ml-Röhrchen ausgepresst.

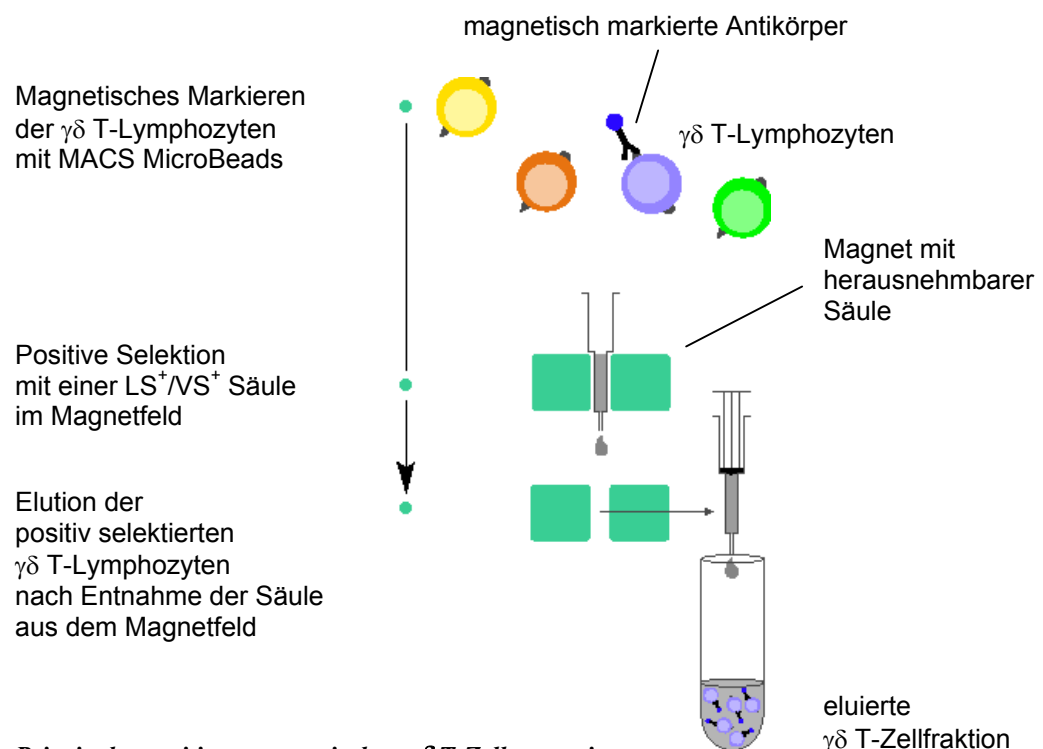


Abbildung 3.1: Prinzip der positiven magnetischen  $\gamma\delta$  T-Zellseparation

### **3.1.5 Durchflusszytometrische Überprüfung der Reinheit**

Von den isolierten Zellen (ca. 5 ml Eluat) wurden 10 µl zur durchflusszytometrischen Überprüfung der Reinheit entnommen und in ein Messröhrchen zusammen mit 200 µl Puffer gegeben. Die Reinheit wurde ohne vorheriges Färben direkt mit dem Durchflusszytometer bestimmt (s. 3.3), da an die magnetischen Beads, die zur Isolierung verwendet wurden, der Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppelt war. Es wurden Reinheiten zwischen 94 % und 98 % gemessen. Bei einer geringeren Reinheit wurde der Schritt der magnetischen Zellseparation mit einer positiven Selektionssäule wiederholt und die Reinheit erneut bestimmt.

## **3.2 Inkubation und Stimulierung der Zellen**

Die  $\gamma\delta$  T-Zellen wurden nach der Isolierung in Medium aufgenommen. Als Medium wurde RPMI 1640 (Cell Concepts, Umkirch, Deutschland) mit folgenden Zusätzen verwendet:

- 10 % FCS (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland)
- 2 mM L-Glutamin (Biochrom, Berlin, Deutschland)
- 100 IU/ml Ampicillin (Roche, Mannheim, Deutschland)
- 100 ng/ml Streptomycin (Roche, Mannheim, Deutschland)
- 100 ng/ml Gentamicin (Roche, Mannheim, Deutschland)

Die Zellkonzentration wurde mit  $5 \times 10^5$  Zellen je ml Medium relativ niedrig angesetzt. Die Zellen konnten ohne Mediumwechsel oder Stimulanzienenerneuerung bis über 10 Tage in Kultur behalten werden, ohne dass ein zu hoher Substratverbrauch registriert wurde (pH-Wert-Kontrolle durch Verwendung von Medium mit Phenolrot).

Die Zellen wurden in einer Mikrotiterplatte (Microtest 96, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) mit 200 µl ( $10^5$  Zellen) je Well inkubiert. Folgende Substanzen wurden in den angegebenen Konzentrationen verwendet und den Ansätzen einzeln oder in Kombination hinzugefügt:

- Interleukine, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  : 10 ng/ml (Cell Concepts, Umkirch, Deutschland)
- TGF- $\beta_1$  : 1 ng/ml (Cell Concepts, Umkirch, Deutschland)
- anti-CD3-Ak : 250 ng/ml (Becton Dickenson, Heidelberg, Deutschland)

Um die zentral auf der Mikrotiterplatte gelegenen Ansätze herum wurden die Wells mit Puffer aufgefüllt, um ein gleichmäßiges Feuchtigkeitsmilieu über allen Ansätzen zu erreichen und eine stärkere Verdunstung der am Rand gelegenen Ansätze zu vermeiden.

Bei den Versuchen mit wenigen Einzelansätzen (z. B. Stimulierung einer großen Zellzahl zur anschließenden Sortierung) wurden auch Mikrotiterplatten mit nur 12 oder 6 Wells verwendet. Die Zellkonzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen je ml Medium wurde jedoch beibehalten.

Die Zellkulturen wurden in einem Inkubator (Steri-Cult 200 Incubator, Forma Scientific, Frankfurt, Deutschland) bei 37 °C mit 92 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub>-Konzentration inkubiert.

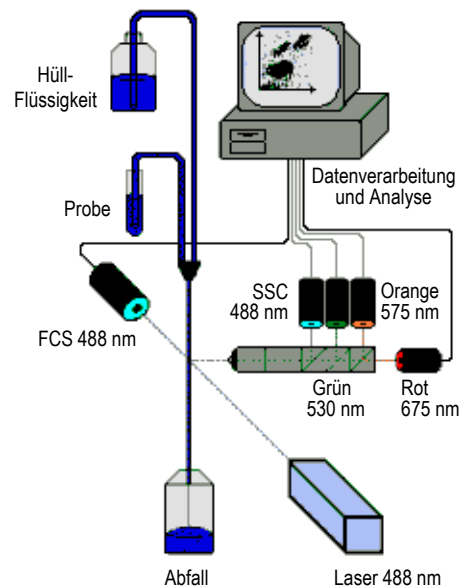
### **3.3 Durchflusszytometrische Messungen**

#### **3.3.1 Prinzip der Durchflusszytometrie**

Im Durchflusszytometer werden die Zellen wie auf einer Perlenschnur einzeln aneinandergereiht durch einen Laserstrahl geführt und so zur Eigenfluoreszenz angeregt. Das resultierende Fluoreszenz- und Streulicht wird von verschiedenen Lichtdetektoren aufgefangen und nach Intensität und Farbe getrennt vom Computer registriert. So wird für jede einzelne gemessene Zelle eine charakteristische Kombination von optischen Eigenschaften aufgezeichnet. Die Daten werden digital aufbereitet und erlauben so eine numerische Auswertung.

Jede der aufgezeichneten optischen Eigenschaften (Streu- und Fluoreszenzlicht) steht für eine bestimmte Eigenschaft der analysierten Zelle. Das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC), d. h. das in Richtung des Laserstrahls gestreute Licht korreliert mit der Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (im rechten Winkel zum Laserstrahl gestreutes Licht) mit der internen Struktur der Zelle (Granularität). Die Grundfluoreszenz der Zellen wird über Messen des Fluoreszenzlichtes bestimmt. Fluoreszenzmarkierte Antikörper, welche an bestimmte Zelloberflächenproteine binden, verändern das Fluoreszenzspektrum der Zellen. Durch verschiedenen Farbfilter und Detektoren können mehrere Wellenlängenbereiche des Fluoreszenzlichts parallel analysiert werden, die den unterschiedlichen verwendeten

Fluoreszenzfarbstoffen entsprechen. Die gemessenen Intensitäten korrelieren mit der Anzahl der gebundenen fluoreszenzmarkierten Antikörper, wodurch quantitative Aussagen über die durchflusszytometrisch analysierten Zellstrukturen möglich sind.



**Abbildung 3.2:** *Schematische Darstellung der Durchflusszytometrie.* Das Flüssigkeitssystem führt die zu analysierende Zelle aus dem Probenröhrchen (Probe) durch den Laserstrahl. Dazu wird der Probenstrahl von einem Hüllstrom (Hüll-Flüssigkeit) zu einem sehr dünnen Flüssigkeitsfaden auseinandergezogen. Das von der Zelle in Richtung des Laserstrahls gestreute Licht wird vom FSC-Detektor (Forward Scatter), das Seitwärtsstreulicht (SSC, Side Scatter) und verschiedene Fluoreszenzfarben rechtwinklig zum Laserstrahl aufgenommen und durch ein Objektivsystem, verschiedene Farbfilter und Teilerspiegel auf die verschiedenen Detektoren gelenkt. Die Signale der Photomultiplier werden verstärkt und können im Computer ausgewertet und dargestellt werden.

### 3.3.2 Messung von Antigenen an der Zelloberfläche

Mit dem Durchflusszytometer FACSCalibur (Becton Dickenson, Heidelberg, Deutschland) konnten mit 2 Lasern bis zu vier verschiedene Fluoreszenzen gleichzeitig gemessen werden. Dabei wurden folgende Fluoreszenzfarbstoffe, die an spezifische monoklonale Antikörper gebunden waren, gemessen:

- Fluoresceinisothiocyanat (FITC)
- Phycoerythrin (PE)
- Carbocyanin 5 (Cy5)
- Allophycocyanin (APC)



Der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid ist ein Farbstoff mit einem ähnlichen Fluoreszenzspektrum wie Carbocyanin (Cy5), der Zellen mit defekter Zellmembran färbt, da er in diese eindringen kann. Durch Zugabe von Propidiumiodid (Sigma Aldrich Chemie, Steinbach, Deutschland) zur Messflüssigkeit in einer Konzentration von 0,5 µg/ml konnten tote oder geschädigte Zellen von den zu messenden vitalen Zellen abgegrenzt werden. Eine gleichzeitige Untersuchung der Oberflächenantigene über den Fluoreszenzfarbstoff Cy5 war dann jedoch nicht möglich.

Folgende fluoreszenzmarkierte Antikörper wurden zur Bestimmung von Antigenen an der Zelloberfläche verwendet:

- γδ TCR (pan) – APC (PharMingen, Hamburg, Deutschland)
- Vγ9 TCR – PE (PharMingen, Hamburg, Deutschland)
- Vδ1 TCR – FITC (PharMingen, Hamburg, Deutschland)
- Vδ2 TCR – FITC (Immunotech, Krefeld, Deutschland)
- Vδ2 TCR – PE (PharMingen, Hamburg, Deutschland)
- Vδ3 TCR – PE (Immunotech, Krefeld, Deutschland)
- CD103 Clone Ber-ACT8 – FITC (Dako Diagnostika, Hamburg, Deutschland)
- CD103 Clone Ber-ACT8 – PE (Dako Diagnostika, Hamburg, Deutschland)

Die zu färbenden Zellen wurden aus der Kultur entnommen und in einem Messröhrchen mit 300 µl über 10 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 µl Antikörperfärbelösung aufgenommen und bei Raumtemperatur über 20 Minuten inkubiert. Die Antikörperfärbelösung bestand aus PBS-FCS und enthielt die fluoreszenzmarkierten Antikörper in einer Konzentration von jeweils 10 µg/ml. Zusätzlich enthielt die Antikörperfärbelösung 0,1 % Natriumazid, um eine evtl. bakterielle Verunreinigung der Antikörperfärbelösung bei längerer Lagerung zu verhindern. Die Inkubation erfolgte in Dunkelheit, da unter Lichteinfluss die Gefahr des Ausbleichens der Fluoreszenzfarbstoffe besteht. Die gefärbten Zellen wurden mit PBS-FCS gewaschen und in 200 µl Messflüssigkeit aufgenommen. Als Messflüssigkeit wurde PBS-FCS oder mit Propidiumiodid versetztes PBS-FCS benutzt.

Bei jedem zu messenden Ansatz wurde ein Teil der Zellen mit nicht spezifisch bindenden fluoreszenzgefärbten IgG<sub>1</sub>-anti-Maus-Antikörpern inkubiert und als Negativ-Kontrolle gemessen. Über die so gemessene Grundfluoreszenz der Zellen konnte ein Schwellenwert

definiert werden. Zellen mit einem Fluoreszenzsignal, das unter diesem Schwellenwert lag, wurden als negativ, Zellen mit einem Fluoreszenzsignal, das über diesem Schwellenwert lag, wurden als positiv bzw. spezifisch gefärbt eingestuft. Ca. 1 % bis 2 % der Zellen in der Negativ-Kontrolle waren falsch positiv. Durch Subtraktion dieses Wertes von jeder einzelnen Messung konnte der Anteil spezifisch gefärbter Zellen bzw. der Anteil der Zellen, die einen definierten Rezeptor exprimierten, exakt bestimmt werden.

Die erhaltenen Messdaten wurden mit der Software CellQuest (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) auf einem Macintosh-Computer dargestellt und analysiert. Das Gerät wurde jeweils so eingestellt, dass nicht mehr als 300 Zellen pro Sekunde gemessen wurden. Je Messprobe wurden etwa 5000 Zellen analysiert. Wenn bei einer Messprobe Zelluntergruppen mit einem sehr geringen Anteil an der Gesamtpopulation von z. B. nur 1 % untersucht werden sollten, wurden bis zu 50000 Zellen gemessen, so dass mindestens 500 Zellen der zu untersuchenden Untergruppe aus der Gesamtpopulation abgegrenzt werden konnten.

### **3.4 Messung der Zellproliferation mit Bromodeoxyuridin (BrdU)**

#### **3.4.1 Inkubation der Zellen mit Bromodeoxyuridin**

Das aus der Gruppe der halogenierten Pyrimidine stammende Thymidinanalogon Bromodeoxyuridin (BrdU) wird aufgrund seiner chemischen Struktur in die DNA von sich teilenden bzw. proliferierenden Zellen eingebaut. Die zu untersuchenden Zell- und Stimulationsansätze wurden einer Konzentration von 10  $\mu$ M BrdU für 2 Stunden im Inkubator ausgesetzt. Das BrdU wurde dem Kulturmedium hinzugegeben, ohne die am Boden der Mikrotiterplatte liegenden Zellen aufzuwirbeln.

#### **3.4.2 Immunfluoreszenzfärbung von Antigen an der Zelloberfläche**

Um die Proliferation von CD103-positiven und CD103-negativen Zellen in einem Ansatz zu vergleichen, wurden die mit BrdU inkubierten Zellen mit dem PE-markierten Antikörper „CD103 Clone Ber-ACT8“ (Dako Diagnostika, Hamburg, Deutschland) gefärbt. Die mit BrdU inkubierten Zellen wurden in Messröhrchen überführt und mit 300 g über 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10  $\mu$ l Antikörperfärbelösung (s. 3.3.2), die den

Antikörper „CD103 Clone Ber-ACT8“ enthielt, aufgenommen und über 30 Minuten bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS-FCS gewaschen.

Die Zellen der Negativ-Kontrolle wurden entsprechend mit nicht spezifisch bindenden PE-gefärbten IgG<sub>1</sub>-anti-Maus-Antikörpern inkubiert.

### **3.4.3 Zellfärbung nach dem „BrdU Flow Kit“-Protokoll**

Die verwendeten Substanzen wurden dem „BrdU Flow Kit“ (PharMingen, Hamburg, Deutschland) entnommen und die Zellen nach dem zugehörigen Protokoll gefärbt.

① Fixieren und permeabilisieren der Zellen mit dem „Cytofix / Cytoperm Buffer“

Die Zellen wurden in 100 µl „Cytofix / Cytoperm Buffer“ aufgenommen und über 30 Minuten bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml „Perm / Wash Buffer“ gewaschen und mit 300 g über 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert.

② Inkubieren der Zellen mit „Cytoperm Plus Buffer“

Die Zellen wurden in 100 µl „Cytoperm Plus Buffer“ aufgenommen und über 10 Minuten bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml „Perm / Wash Buffer“ gewaschen und wie unter ① beschrieben zentrifugiert.

③ Refixieren der Zellen

Die Zellen wurden in 100 µl „Cytofix / Cytoperm Buffer“ aufgenommen und über 5 Minuten bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml „Perm / Wash Buffer“ gewaschen und wie unter ① beschrieben zentrifugiert.

④ Behandlung der Zellen mit DNase, um das eingebaute BrdU zu freizulegen

Die Zellen wurden in 100 µl DNase-Puffer (PBS mit 300 µg/ml DNase) aufgenommen und über 1 Stunde im Wasserbad bei 37 °C in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml „Perm / Wash Buffer“ gewaschen und wie unter ① beschrieben zentrifugiert.

⑤ Färben des intrazellulär eingebauten BrdU mit anti-BrdU-Antikörpern

Die Zellen wurden in 50 µl „Perm / Wash Buffer“ aufgenommen, der den FITC-markierten anti-BrdU-Antikörper in einer Konzentration von 200 µg/ml enthielt. Die Inkubation erfolgte über 20 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml „Perm / Wash Buffer“ gewaschen und wie unter ① beschrieben zentrifugiert.

Die Zellen der Negativ-Kontrolle wurden entsprechend mit nicht spezifisch bindenden FITC-gefärbten IgG<sub>1</sub>-anti-Maus-Antikörpern inkubiert.

⑥ Aufnahme der Zellen in Messflüssigkeit und durchflusszytometrische Analyse

Die Zellen wurden in 200 µl PBS-FCS aufgenommen und mit dem Durchflusszytometer wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben gemessen. Das Fluoreszenzmuster der Zellen, die nach dem „BrdU Flow Kit“-Protokoll behandelt worden waren, unterschied sich deutlich von dem vitaler Lymphozyten. Die Kompensationen und Verstärkungen der einzelnen Fluoreszenzsignale mussten am Durchflusszytometer entsprechend verändert und an die BrdU-Messung angepasst werden.

### 3.5 Zellsortierung

Das Prinzip der Zellsortierung basiert auf dem der Durchflusszytometrie. Wie bei der Durchflusszytometrie werden die Zellen mittels Laserstrahl zur Fluoreszenz angeregt und das emittierte Licht wird über Detektoren gemessen. Die Zellen werden auf einzelne Tröpfchen verteilt als Strahl aneinandergereiht aus einer Düse ausgestoßen. Durch ihre elektrische Ladung lassen sich die einzelnen Tröpfchen in einem elektrischen Feld so ablenken, dass sie auf bis zu vier verschiedene Sortierröhrchen gezielt verteilt werden können.

Die zu sortierenden Zellen wurden aus der Kultur entnommen, in ein Sortierröhrchen überführt und mit 300 g über 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 100 µl Antikörperfärbelösung aufgenommen. Die Inkubation erfolgte über 20 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit. Die Antikörperfärbelösung enthielt den PE-markierten anti-CD103-Antikörper in einer Konzentration von 10 µg/ml. Die gefärbten Zellen wurden durch Zugabe von 2 ml PBS-FCS und anschließendem Zentrifugieren gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 2 ml PBS-FCS aufgenommen.

Die gefärbten Zellen wurden mit dem Zellsortierer MoFlo (Cytomation Bioinstruments,

Freiburg, Deutschland) nach CD103-positiven und CD103-negativen Zellen in zwei verschiedene Röhrchen sortiert. Zellen, die aufgrund ihrer Fluoreszenzstruktur nicht sicher vitale Lymphozyten mit eindeutiger CD103-positiver oder CD103-negativer Eigenschaft waren, wurden verworfen. Die sortierten Zellen wurden bei 4 °C gekühlt gehalten. Der Zellsortierer wurde über die mitgelieferte Software „Summit v3.0“ gesteuert. Es wurde mit einer Geschwindigkeit von etwa 3000 Zellen je Sekunde sortiert. Die Reinheit der sortierten Zellen wurde anschließend mit dem Durchflusszytometer geprüft und lag bei über 95 %.

### **3.6 Analyse der $\gamma\delta$ T-Zellen der Zelllinie „Loucy“ mittels Genchips**

Mit dem Genchip U95A (Affymetrix Ltd., High Wycombe, United Kingdom) war es möglich, die Expression von 12626 verschiedenen humanen Genen parallel zu analysieren. Je Genchip wurde die mRNA von etwa  $1 \times 10^7$  Zellen benötigt. Zum Vergleich der Genexpression von CD103-positiven und CD103-negativen  $\gamma\delta$  T-Zellen auf zwei getrennten Genchips wurden also etwa  $2 \times 10^7$   $\gamma\delta$  T-Zellen benötigt. Da aus 100 ml humanem Vollblut nur etwa 2 bis  $4 \times 10^6$   $\gamma\delta$  T-Lymphozyten isoliert werden konnten, wurden für die Genchipanalyse die  $\gamma\delta$  T-Zellen einer humanen Tumorzelllinie verwendet.

Bei der Tumorzelllinie „Loucy“ (DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland) handelt es sich um eine reine  $\gamma\delta$  T-Zelllinie, welche aus dem peripheren Blut einer 38-jährigen Frau mit lymphoblastischer Leukämie gewonnen worden war. Die Verdoppelungszeit der Zellen in Kultur beträgt 60 Stunden. Nach dem Ausfrieren der bei -80 °C gelagerten Zellen wurden diese in Medium aufgenommen und wie die aus humanem Vollblut isolierten  $\gamma\delta$  T-Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Es wurden  $1 \times 10^7$  Zellen der humanen  $\gamma\delta$  T-Zelllinie „Loucy“ der Kultur entnommen und über 96 Stunden in Anwesenheit der Zytokine TGF- $\beta_1$  und IL-15 inkubiert. Dazu wurden die  $1 \times 10^7$  Zellen in 8 ml Medium aufgenommen, die Zytokine TGF- $\beta_1$  und IL-15 in der üblichen Konzentration hinzugefügt und die Zellsuspension danach in 2 Wells einer 6-Well-Mikrotiterplatte (Microtest 6, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) gegeben. Die Zellkonzentration war damit 2 ½ mal höher als die, die zur Inkubation der aus humanem Vollblut isolierten  $\gamma\delta$  T-Zellen verwendet wurde. Der Kultur wurden nach 24 Stunden 8 ml

Medium mit den entsprechenden Zytokinen hinzugefügt und die Zellsuspension auf 4 Wells verteilt. Das Volumen der Kultur wurde somit verdoppelt, die Konzentration von TGF- $\beta_1$  und IL-15 blieb jedoch konstant. Nach 72 Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugieren mit 300 g über 10 Minuten und erneute Aufnahme in 16 ml Medium gewaschen. Die Zytokine wurden in der entsprechenden Konzentration hinzugefügt und die Zellkultur für weitere 24 Stunden inkubiert. Nach 96 Stunden hatte sich die Zellzahl der Tumorzelllinie auf etwa  $3 \times 10^7$  Zellen verdreifacht ( $2^{96 \text{ h} / 60 \text{ h}} = 2^{1,6} \approx 3$ ). Die Zellen wurden wie in Kapitel 3.5 beschrieben nach CD103-positiven und CD103-negativen Zellen sortiert.

Etwa 20 % der  $3 \times 10^7$  sortierten  $\gamma\delta$  T-Zellen waren CD103-positiv. Es konnten also  $6 \times 10^6$  CD103-positive Zellen und  $6 \times 10^6$  CD103-negative Zellen auf je einem Genchip analysiert werden. Um die Ergebnisse der beiden Genchipanalysen direkt miteinander vergleichen zu können, musste für jeden Genchip die gleiche mRNA-Menge bzw. die gleiche Zellzahl verwendet werden.

Die Zellen wurden nach der Sortierung erneut in Medium aufgenommen und für 5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 300 g über 10 Minuten zentrifugiert und jeweils in ein RNase-freies 1,5-ml-Röhrchen überführt. Zur Gesamt-RNA-Isolierung nach der von Affymetrix empfohlenen Trizol-Methode wurden die Zellen nach erneuter Zentrifugation in jeweils 1 ml Trizol (Sigma Aldrich Chemie, Steinbach, Deutschland) aufgenommen und anschließend bei –80 °C tiefgefroren. Die Messungen wurden im Labor der Bayer AG in Leverkusen durchgeführt. Die mit der Microarray Analysis Suite Software (Affymetrix Ltd., High Wycombe, United Kingdom) gemessenen Daten wurden in einer Excel-Tabelle (Microsoft, Deutschland) zusammengefasst und ausgewertet.

Für jedes der 12626 untersuchten Gene wurde ein Zahlenwert angegeben, welcher der synthetisierten mRNA-Menge der Zellen für dieses Gen entsprach. Es wurde nach Genen gesucht, bei denen sich die Expression in den beiden Proben signifikant voneinander unterschied.

### **3.7 Analyse der Genexpression mittels Polymerasekettenreaktion**

#### **3.7.1 Isolierung der Gesamt-RNA**

Die Isolierung der RNA ist eine Voraussetzung für die Analyse der Genexpression mit der Polymerasekettenreaktion. Die in den Zellen vorhandene mRNA ist eine Kopie des codogenen DNA-Stranges und dient als Matrize für die Proteinbiosynthese. Damit lässt sich durch den indirekten Nachweis von mRNA mittels Polymerasekettenreaktion auf die Proteinbiosynthese der Zellen schließen.

Die Gesamt-RNA wurde mit dem „High Pure RNA Isolation Kit“ (Roche, Mannheim, Deutschland) isoliert. Es wurde das Standard-Protokoll zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Kulturzellen verwendet.

- ① Je Ansatz wurden etwa  $5 \times 10^5$  Zellen aus der Kultur entnommen und mit 300 g über 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 200 µl PBS aufgenommen und die resuspendierten Zellen in ein RNase-freies 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt.
- ② Es wurden 400 µl „Lyse-/Bindepuffer“ dazugegeben und gut mit der Zellsuspension durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt. Anschließend folgte eine Inkubation über 5 Minuten bei Raumtemperatur.
- ③ Das „High Pure Filter Tube“ wurde in ein Auffanggefäß eingesetzt und die Probe in das obere Reservoir pipettiert. Die Probe wurde mit 8000 g über 1 Minute zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und das „High Pure Filter Tube“ in das bereits benutzte Auffanggefäß erneut eingesetzt.
- ④ Pro Ansatz wurden 90 µl „DNase Inkubationspuffer“ in ein RNase-freies 1,5-ml-Reaktionsgefäß pipettiert, 10 µl „DNase I“ dazugegeben und gemischt. Es wurden jeweils 100 µl der Lösung in das obere Reservoir des „High Pure Filter Tube“ direkt auf das Glasvlies pipettiert. Es folgte eine Inkubation über 15 Minuten bei Raumtemperatur.
- ⑤ Es wurden 500 µl „Waschpuffer I“ in das obere Reservoir gegeben und wie unter ③ beschrieben zentrifugiert.
- ⑥ Es wurden 500 µl „Waschpuffer II“ in das obere Reservoir gegeben und wie unter ③ beschrieben zentrifugiert.

- ⑦ Es wurden 200 µl „Waschpuffer II“ in das obere Reservoir gegeben und mit 13000 g über 2 Minuten zentrifugiert, um Reste des Waschpuffers zu entfernen.
- ⑧ Das Auffanggefäß wurde verworfen und das „High Pure Filter Tube“ in ein RNase-freies 1,5-ml-Reaktionsgefäß eingesetzt.
- ⑨ Zur Elution der RNA wurden 50 µl „Elutionspuffer“ in das „High Pure Filter Tube“ gegeben und über 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die RNA zusammen mit dem Elutionspuffer durch Zentrifugation mit 13000 g über 1 Minute in das RNase-freie 1,5-ml-Reaktionsgefäß ausgewaschen.

### 3.7.2 Reverse Transkription

Die gewonnene RNA wurde mit dem „ProSTAR™ First-Strand RT-PCR Kit“ (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) in cDNA transkribiert.

- ① Von den isolierten RNA-Proben wurden jeweils 38 µl entnommen und in neue RNase-freie 1,5-ml-Reaktionsgefäße pipettiert.
- ② Zu den 38 µl wurden 3 µl „oligo(dT) primer“ (100 ng/µl) gegeben und sachte gemischt.
- ③ Die Proben wurden bei 65 °C in einem Heizblock für 5 Minuten inkubiert und danach langsam (10 Minuten) auf Raumtemperatur abgekühlt, um die Primer an die RNA binden zu lassen.
- ④ Folgende Komponenten wurden in der angegebenen Reihenfolge hinzugefügt:
  - 5 µl „10x first-strand buffer“
  - 1 µl „RNase Block Ribonuclease Inhibitor“ (40 U/µl)
  - 2 µl „100 mM dNTPs“
  - 1 µl „StrataScript™ reverse transcriptase“ (50 U/µl)
- ⑤ Die Proben wurden sachte gemischt und bei 37 °C im Wasserbad für 1 Stunde inkubiert.
- ⑥ Danach wurden die Proben bei 90 °C in einem Heizblock für 5 Minuten inkubiert. Die synthetisierte cDNA wurde auf Eis gelagert oder bei keiner direkten Weiterverarbeitung bei –80 °C eingefroren.



### 3.7.3 Polymerasekettenreaktion

Für jeden PCR-Ansatz wurden 5 µl der cDNA in ein dünnwandiges PCR-Röhrchen pipettiert. Die nicht verwendete cDNA wurde bei –80 °C eingefroren. Zu den 5 µl cDNA wurden jeweils 20 µl eines PCR-Substrat-Mixes hinzugefügt, der sich pro Ansatz wie folgt zusammensetzte:

- 13,37 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltes Wasser
- 2,50 µl „10x PCR buffer“, ergänzt mit MgCl<sub>2</sub> (15 mM)
- 2,00 µl dNTPs (2,5 mmol/1,28 ml)
- 0,13 µl „Ampli Taq DNA Polymerase“ (5 U/ml)
- 1,00 µl Sense-Primer (10 µM)
- 1,00 µl Anti-Sense-Primer (10 µM)

Folgende Primerpaare wurden verwendet:

- Cyclophilin (326 Basenpaare)  
Sense-Primer (5'-CATCTGCACTGCCAAGACTG-3')  
Anti-Sense-Primer (5'-CTGCAATCCAGCTAGGCATG-3')
- Integrin  $\alpha^E\beta_7$  (447 Basenpaare)  
Sense-Primer (5'-AGGGTGTTGAGCGCTTTGCCATTG-3')  
Anti-Sense-Primer (5'-GAGCCCCGCGACGTAGGAGAG-3')
- Humane Pankreatische Elastase IIA (407 Basenpaare)  
Sense-Primer (5'-CCCTGCTCAAACCTGGCTAACC-3')  
Anti-Sense-Primer (5'-GTAATTGGAGACCGCGTGAAGAC-3')

Die optimale Bindungs-Temperatur aller Primer lag bei 60 °C. Die cDNA wurde im Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) nach folgendem Schema amplifiziert:

Initialphase:	5:00 Minuten	95 °C
35 Zyklen (bei Cyclophilin 30 Zyklen):		
Denaturierungsphase:	45 Sekunden	94 °C
Primer-Bindungs-Phase:	45 Sekunden	60 °C
Elongationsphase:	60 Sekunden	72 °C
Abschlussphase:	10:00 Minuten	72 °C

**Tabelle 3.1:** *Phasenabfolge des PCR-Programms.*

### 3.7.4 Gelelektrophorese

Jeweils 5 µl der amplifizierten cDNA aus einem PCR-Röhrchen wurden zusammen mit 0,2 µl Auftragpuffer (50,00 % Glycerin, 0,42 % Xylen-Cyanol, 0,42 % Bromphenolblau, 49,16 % destil. H<sub>2</sub>O) in eine Geltasche eines Agarose-Gels pipettiert. In eine am Rand gelegene Geltasche wurde ein DNA-Marker pipettiert. Zur Herstellung des Agarose-Gels wurde Agarose (Boehringer, Mannheim, Deutschland) in einer Konzentration von 1,5 % in TBE-Puffer (Sigma Aldrich Chemie, Steinbach, Deutschland) gelöst und zum Kochen gebracht. Das flüssige Gel wurde in eine entsprechende Elektrophorese-Form gegossen, in der es beim Abkühlen aushärtete. In dem alkalischen Milieu des Gels mit einem pH-Wert von etwa 8,0 lagen die cDNA-Moleküle wegen ihres Säurecharakters dissoziiert vor. Mit dem Elektrophorese-System Power Pac 200 (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) wurde das Gel einem homogenen elektrischen Feld ausgesetzt. In diesem Spannungsfeld wanderten die positiven cDNA-Moleküle je nach ihrem Molekulargewicht unterschiedlich schnell in Richtung Kathode. Es wurde eine Spannung von 100 V über 90 Minuten angelegt. Die Stromstärke wurde auf 0,2 A begrenzt.

### **3.7.5 Photometrische Analyse des Gels**

Die im Gel fixierten cDNA-Moleküle wurden 20 Minuten lang durch Schwenken des Gels in einer wässrigen Ethidiumbromid-Lösung (20 mg/ml) gefärbt. Danach wurde das nicht an cDNA-Moleküle gebundene Ethidiumbromid in einem Wasserbad über 10 Minuten aus dem Gel wieder herausgewaschen. Anschließend wurde das Gel mit einem digitalen Gel-Dokumentations-System (biostep Labor- und Systemtechnik, Jahnsdorf, Deutschland) unter UV-Beleuchtung über Videokamera aufgenommen. Die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid gefärbten cDNA-Banden konnten mit der zugehörigen Software „Phoretix Grabber v2.0“ dargestellt und analysiert werden. Da die Laufweite der cDNA-Moleküle von ihrem Molekulargewicht abhing, konnten die cDNA-Banden mit Hilfe des DNA-Markers eindeutig identifiziert werden. Das Molekulargewicht der cDNA-Moleküle ergab sich aus der Anzahl der Basenpaare und war damit bekannt. Die Breite und Helligkeit der fluoreszierenden Bande gab Aufschluss über die relative Menge der amplifizierten cDNA und damit indirekt über die Menge der in den Zellen synthetisierten mRNA. Für jede Messung wurde die cDNA vom Haushaltsgen Cyclophilin mitbestimmt. Das Haushaltsgen Cyclophilin wurde von den Zellen in den verschiedenen Ansätzen in gleichem Maße transkribiert. Bei unterschiedlichen cDNA-Mengen, z. B. aufgrund unterschiedlicher Zellzahlen in den Kulturen, konnten die Messergebnisse mit Hilfe der Haushaltsgen-Messung normiert werden und waren damit direkt miteinander vergleichbar.

## **3.8 Auswertung und Statistik**

Die statistische Auswertung der gemessenen Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 10.0 für Windows. Es wurden die Messwerte der einzelnen Stichproben einer Versuchsreihe als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Die einzelnen Stichproben der Versuche waren unverbunden, da die Zellen in den verschiedenen Ansätzen, die miteinander verglichen wurden, nicht aus ein und derselben Isolierung stammten. Mit Hilfe des nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Tests wurde untersucht, ob sich die Ergebnisse von je zwei Versuchsreihen signifikant voneinander unterschieden. Er ist äquivalent zum Wilcoxon-Rangsummentest und zum Kruskal-Wallis-Test für zwei Gruppen. Eine Signifikanz wurde bei  $p < 0,050$  angenommen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Überprüfung der Methode zur Isolierung der $\gamma\delta$ T-Zellen

#### 4.1.1 Quantitative Ergebnisse der Isolierung

Die  $\gamma\delta$  T-Zellen wurden ausschließlich aus dem peripheren venösen Vollblut von gesunden Spenderinnen und Spendern isoliert. Aus 108 ml Blut konnten mit der Ficoll-Paque®-Dichtezentrifugation etwa  $1 \times 10^8$  bis  $2 \times 10^8$  mononukleäre Zellen gewonnen werden. Bei allen Spenderinnen und Spendern lag der Anteil an  $\gamma\delta$  T-Zellen, die aus den mononukleären Zellen mittels magnetischer Zellseparation isoliert wurden, durchschnittlich bei etwa 2 %. Damit konnten je Spenderin bzw. Spender etwa  $2 \times 10^6$  bis  $4 \times 10^6$   $\gamma\delta$  T-Lymphozyten gewonnen und für weitere Experimente genutzt werden.

#### 4.1.2 Qualitative Ergebnisse der Isolierung

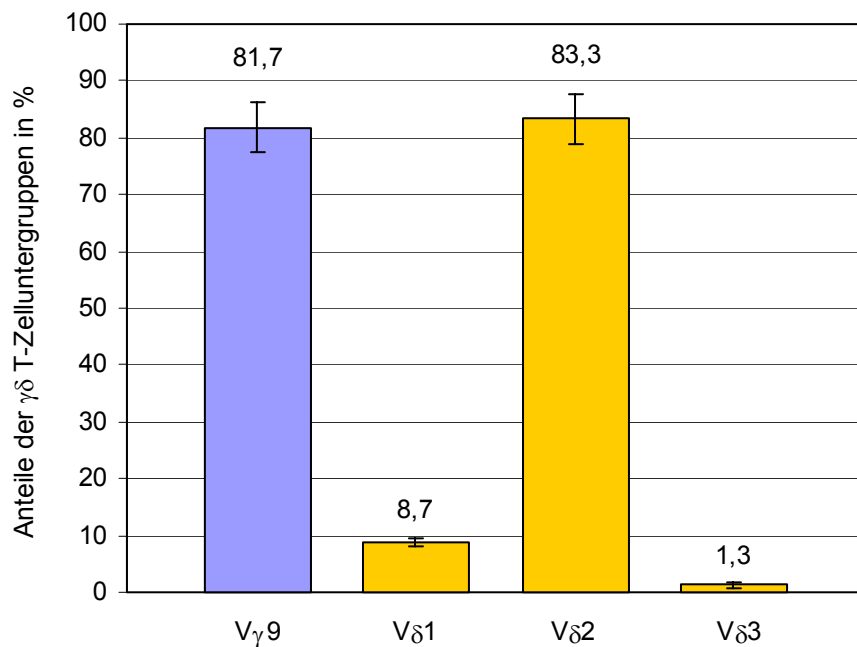
Die Reinheit der mit FITC markierten  $\gamma\delta$  T-Zellen wurde direkt nach der Isolierung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Isolate zeigten eine Reinheit zwischen 94 % und 98 %. Es ist jedoch möglich, dass eine unspezifische Bindung der FITC-markierten Beads an Zellen ohne  $\gamma\delta$  T-Zellrezeptor die Reinheit der isolierten Zellen beeinträchtigen könnte, ohne dass sie als Verunreinigung auffiele. Laut Herstellerangaben binden die Beads über die monoklonalen anti- $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor-Antikörper hochspezifisch an  $\gamma\delta$  T-Zellen. Eine wesentliche Verunreinigung, welche bei der Bestimmung der Reinheit nicht auffallen würde, ist daher nicht zu erwarten.

Die durchflusszytometrische Kontrolle des freien Durchlaufs wies fast ausschließlich unmarkierte Zellen auf. Die getrennte Färbung und Messung der  $\gamma\delta$  T-Zellen mit dem APC-markierten Antikörper „ $\gamma\delta$  TCR (pan)“ bei einem Teil der mononukleären Zellen vor der Isolierung ergab einen  $\gamma\delta$  T-Zell-Anteil von 2 %. Dieser stimmte mit dem Anteil der anschließend isolierten  $\gamma\delta$  T-Zellen überein. Man kann also davon ausgehen, dass mit der Methode der magnetischen Zellseparation nahezu alle  $\gamma\delta$  T-Zellen aus den mononukleären Zellen gewonnen werden.

#### 4.1.3 Verhältnisse der $\gamma\delta$ T-Zelluntergruppen vor und nach der Isolierung

Sowohl vor als auch direkt nach der Isolierung wurde der Anteil der verschiedenen Untergruppen der  $\gamma\delta$  T-Zellen bestimmt. Es zeigte sich, dass durch die magnetische Zellseparation keine der gemessenen Untergruppen bevorzugt isoliert wurde. Die von den Probanden vorgegebenen Untergruppenverhältnisse blieben also erhalten.

Der Hauptanteil wurde von  $V\gamma 9$  und  $V\delta 2$  Zellen mit etwa 75 % bis 85 % gebildet. Etwa 8 % bis 10 % der Zellen waren  $V\delta 1$  positive und nur etwa 1 % der Zellen waren  $V\delta 3$  positive  $\gamma\delta$  T-Zellen. Es zeigten sich geringe individuelle Unterschiede im Verteilungsmuster.



**Abbildung 4.1:** Untergruppen der  $\gamma\delta$  T-Zellen und ihr relativer Anteil an der Gesamtpopulation der isolierten Zellen. Die isolierten Zellen wurden mit entsprechenden PE-markierten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 5 unabhängigen Messungen.

#### 4.1.4 Potentielle Beeinflussung der Ergebnisse durch die Methode der Isolierung

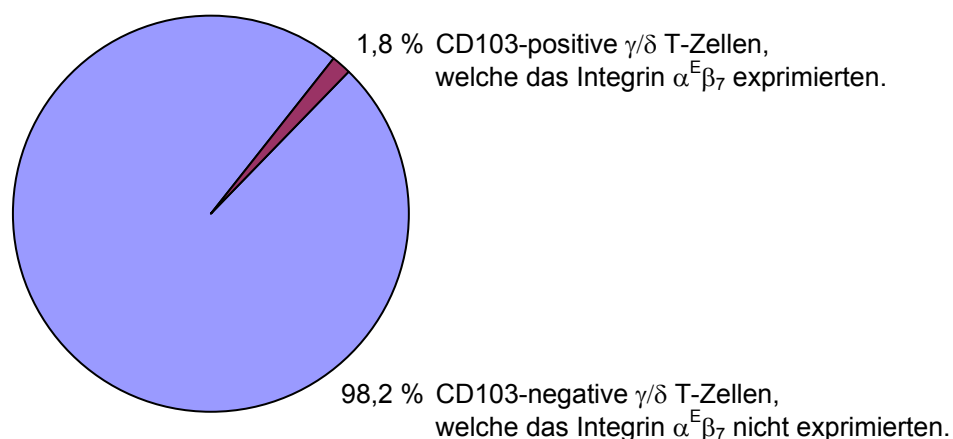
Durch die Methode der positiven magnetischen Zellseparation sind alle  $\gamma\delta$  T-Zellen nach der Isolierung mit  $\gamma\delta$  T-Zellrezeptor-Antikörpern beladen. Dies könnte die gleichzeitige Anfärbbarkeit der einzelner  $\gamma\delta$  T-Zelluntergruppen z. B. über eine kompetitive Hemmung beeinflussen und die gemessenen Ergebnisse verfälschen. Die 5 Tage in Kultur gehaltenen

Zellen wiesen jedoch das gleiche Untergruppenverhältnis wie das direkt nach ihrer Isolierung gemessene auf. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die nach der Isolierung bestimmte Subtypverteilung den tatsächlichen Verhältnissen entsprach.

Des Weiteren ist eine Beeinflussung der Zellen durch die mit Antikörpern besetzten  $\gamma\delta$  T-Zellrezeptoren nicht auszuschließen. Die meisten Antikörper diffundierten jedoch innerhalb der ersten Tage von ihrem Rezeptor oder wurden zusammen mit ihrem Rezeptor abgestoßen. Aufgrund der geringen Antikörper-Konzentration im Medium werden die  $\gamma\delta$  T-Zellrezeptoren der Zellen nicht neu besetzt und eine weitere Stimulation der Zellen über diesen Rezeptor findet nicht statt. Dies wurde sowohl durch die Abnahme der FITC-Fluoreszenz der  $\gamma\delta$  T-Zellen als auch durch die erneute Anfärbbarkeit der Zellen über den  $\gamma\delta$  T-Zellrezeptor nach 2 Tagen Inkubation bestätigt.

#### 4.2 Expression des Integrins $\alpha^E\beta_7$ vor Inkubation

Nur etwa 1,5 % bis 2,1 % ( $1,8 \% \pm 0,34 \%$ ) der aus dem venösen Vollblut isolierten  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten exprimierten das Integrin  $\alpha^E\beta_7$ . Es zeigten sich diesbezüglich kaum individuelle Unterschiede zwischen den verschiedenen Probanden. Alle untersuchten Untergruppen der  $\gamma\delta$  T-Zellen exprimierten das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  in gleichem Maße.



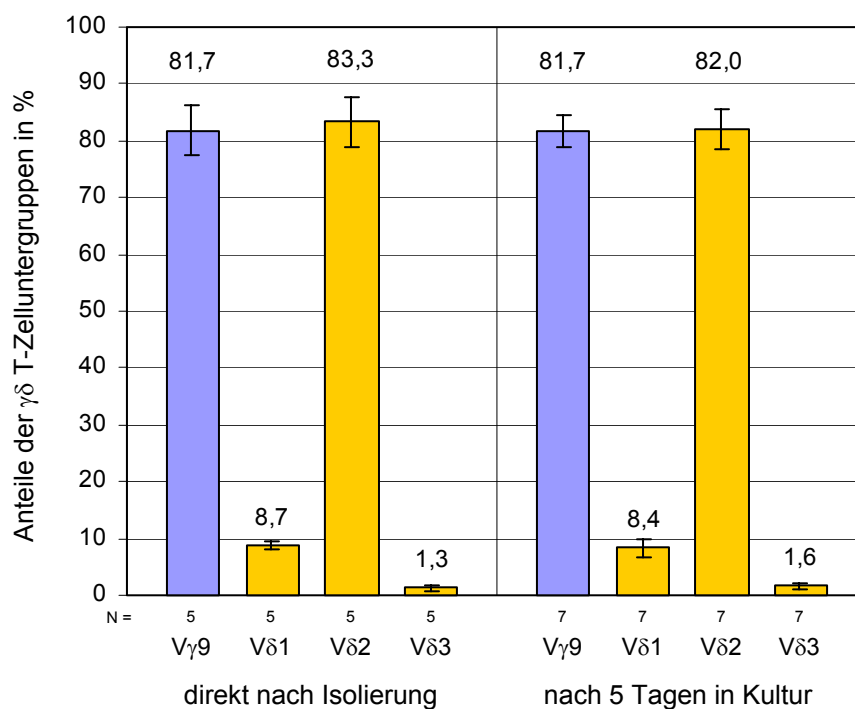
**Abbildung 4.2:** Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  auf humanen  $\gamma\delta$  T-Zellen nach Isolierung aus venösem Vollblut. Die isolierten Zellen wurden mit PE-markiertem anti-CD103-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert von 5 unabhängigen Isolierungen.

### 4.3 Analyse der Zellen nach 5 Tagen Inkubation

#### 4.3.1 Inkubation der $\gamma\delta$ T-Zellen ohne Zugabe von Stimulanzen zum Medium

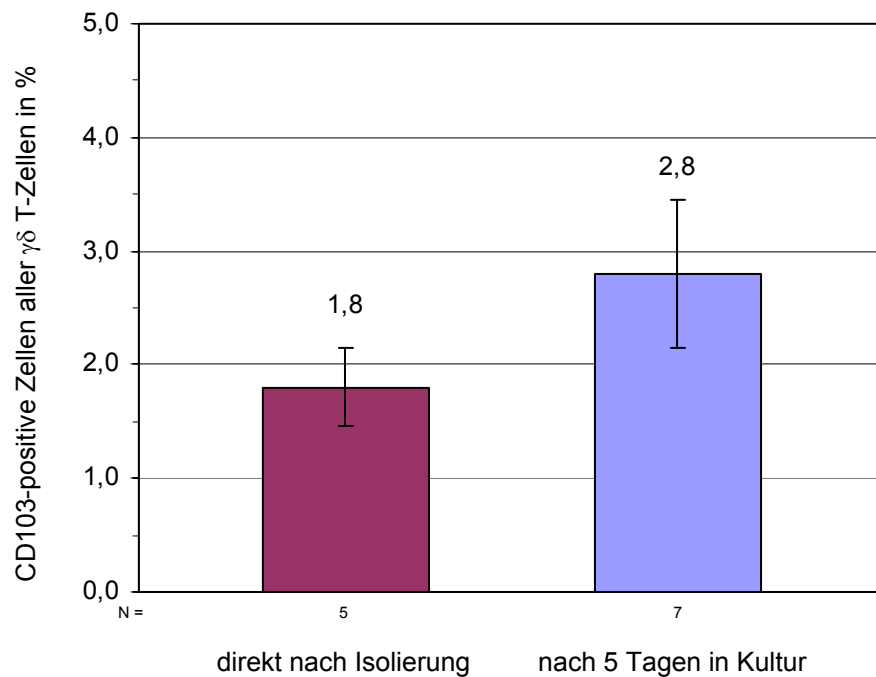
Die  $\gamma\delta$  T-Zellen wurden wie in Kapitel 3.2 beschrieben inkubiert. Nach 5 Tagen Inkubation wurden die Zellen aus der Kultur entnommen und durchflusszytometrisch analysiert. Von dem Integrin  $\alpha^E\beta_7$  war nicht bekannt, ob es nach entsprechender Stimulation von den  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten innerhalb weniger Stunden oder erst nach einigen Tagen exprimiert wird. Da die meisten  $\gamma\delta$  T-Zellen ohne Zugabe von Stimulanzen nach 6 bis 7 Tagen in Kultur ihre Viabilität verloren, wurde die Inkubationszeit auf 5 Tage festgelegt.

Es wurde zunächst untersucht, ob sich die  $\gamma\delta$  T-Zelluntergruppenverhältnisse in Kultur nach 5 Tagen geändert hatten. Die Ergebnisse zeigen, dass die Verhältnisse der Subtypen  $V\gamma 9$ ,  $V\delta 1$ ,  $V\delta 2$  und  $V\delta 3$  nach 5 Tagen Inkubation den Verhältnissen nach der Isolierung bzw. vor Inkubation entsprachen. Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede.



**Abbildung 4.3:** Vergleich der relativen Anteile der  $\gamma\delta$  T-Zelluntergruppen direkt nach der Isolierung und nach 5 Tagen in Kultur. Die Zellen wurden mit entsprechenden PE-markierten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 5 bzw. 7 unabhängigen Messungen. Die exakten Signifikanzen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests für zwei unabhängige Stichproben ermittelt und betrugen  $p_{V\gamma 9} = 0,876$ ,  $p_{V\delta 1} = 0,530$ ,  $p_{V\delta 2} = 0,639$  und  $p_{V\delta 3} = 0,755$ .

Nach 5 Tagen Inkubation wurden die Zellen zusätzlich mit einem fluoreszenzmarkierten anti-CD103-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. In den 7 unabhängigen Ansätzen exprimierten nach 5 Tagen durchschnittlich 2,8 % der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  bei einem SEM von  $\pm 0,65$  Prozentpunkten. Alle untersuchten  $\gamma\delta$  T-Zelluntergruppen wiesen, wie auch bei den Messungen vor der Inkubation, die gleiche Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  auf.



**Abbildung 4.4:** Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  auf humanen  $\gamma\delta$  T-Zellen direkt nach der Isolierung und nach 5 Tagen in Kultur. Die Zellen wurden mit PE-markierten anti-CD103-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 5 bzw. 7 unabhängigen Messungen.

Mit einer exakten Signifikanz von  $p = 0,202$  bzw. einer asymptotischen Signifikanz (zweiseitig) von  $p = 0,164$  zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression direkt nach der Isolierung und der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression nach 5 Tagen Inkubation in Kultur.

Nun stellte sich die Frage, ob und wie die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  bei den isolierten  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten in Kultur signifikant gesteigert werden könnte. Welche Zytokine und ggf. auch welche stimulierenden Antikörper müssten dafür dem Medium zugesetzt werden?



#### 4.3.2 Suche nach geeigneten Substanzen zur Stimulierung der $\gamma\delta$ T-Zellen

Da nicht bekannt war, in Anwesenheit welcher Substanzen  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten so stimuliert werden, dass sie das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  verstärkt exprimieren, wurden die isolierten Zellen in einer Art Screening-Verfahren in Anwesenheit verschiedener Zytokine inkubiert. Die Zytokine wurden in den für Lymphozytenkulturen gebräuchlichen Konzentrationen (s. 3.2) dem Medium zugesetzt. Die Zellen wurden nach 5 Tagen Inkubation durchflusszytometrisch analysiert. Es wurde auch analysiert, ob sich die  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten mit anti-CD3-Antikörpern aktivieren lassen. Bei  $\alpha\beta$  T-Zellen kann über diesen mit dem T-Zellrezeptor assoziierten Komplex eine auf die Zellen aktivierend wirkende Signaltransduktion ausgelöst werden. Bei  $\gamma\delta$  T-Zellen, welche diesen CD3-Rezeptor ebenfalls besitzen, ist über dessen Funktion noch nichts bekannt. Von einer Stimulation über den CD4- oder CD8-Rezeptor wurde abgesehen, da die meisten  $\gamma\delta$  T-Zellen im Unterschied zu  $\alpha\beta$  T-Zellen diese Rezeptoren nicht besitzen. Dies wurde durchflusszytometrisch bestätigt.

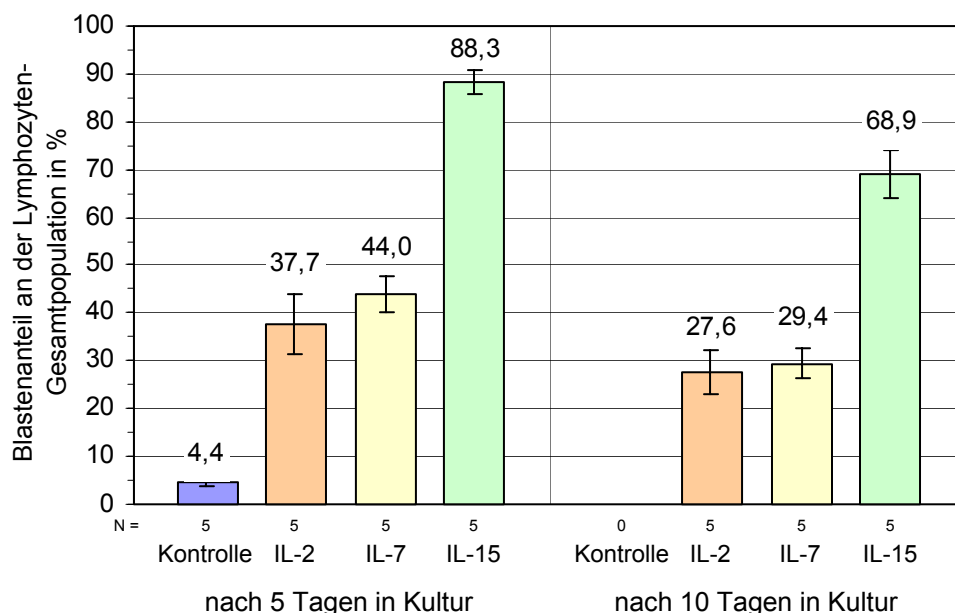
Die isolierten  $\gamma\delta$  T-Zellen wurden in Anwesenheit der Interleukine 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 12, 13 und 15, der Zytokine IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta_1$  und TNF- $\alpha$ , sowie in Anwesenheit von anti-CD3-Ak inkubiert. Die Interleukine IL-12 und IL-4 sind u. a. bei der Antigen-Präsentation von „Dendritischen Zellen“ und an der Reifung von T-Helfer-Lymphozyten beteiligt. IL-2 wird von den T-Helfer-Lymphozyten gebildet und wirkt einerseits autokatalytisch, kann aber auch „Natürliche Killerzellen“ und zytotoxische T-Lymphozyten stimulieren. Die Lymphokine IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 werden ebenfalls von T-Helfer-Zellen sezerniert und stimulieren Makrophagen und B-Lymphozyten. Eine Inkubation der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten in Anwesenheit der o. g. Zytokine, welche an vielfältigen immunologischen Reaktionen mitwirken, schien sinnvoll. Des Weiteren sollte eine Stimulation mit den Zytokinen IL-3, IL-7, IL-9, IL-15, TGF- $\beta_1$  und TNF- $\alpha$  versucht werden. In den verschiedenen Ansätzen wurden die Zusätze systematisch miteinander kombiniert.

Als Parameter für eine Aktivierung wurde die Expression des  $\alpha^E\beta_7$ -Antigens gewählt. Darüber hinaus wurden die Zellgröße und die Granularität der Zellen über das Vorwärts- bzw. Seitwärtsstreulicht gemessen. Die Inkubation in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  führte zu keiner messbaren Aktivierung der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten. In Kombination mit anderen Zytokinen, welche teilweise stimulierend wirkten, zeigten IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  auch keine modulierende Wirkung. Ebenso ließen sich die  $\gamma\delta$  T-Zellen nicht durch die Interleukine 3, 4,

5, 9, 10, 12 oder 13 beeinflussen. Das Verhältnis der gemessenen  $\gamma\delta$  T-Zelluntergruppen blieb ebenfalls konstant und die Zellen verloren nach 6 bis 7 Tagen in Kultur ihre Viabilität. Wie bereits in Kapitel 4.3.1 erwähnt, wurde deshalb eine Inkubationsdauer von 5 Tagen gewählt.

#### 4.3.3 Inkubation der $\gamma\delta$ T-Zellen in Anwesenheit der Interleukine 2, 7 und 15

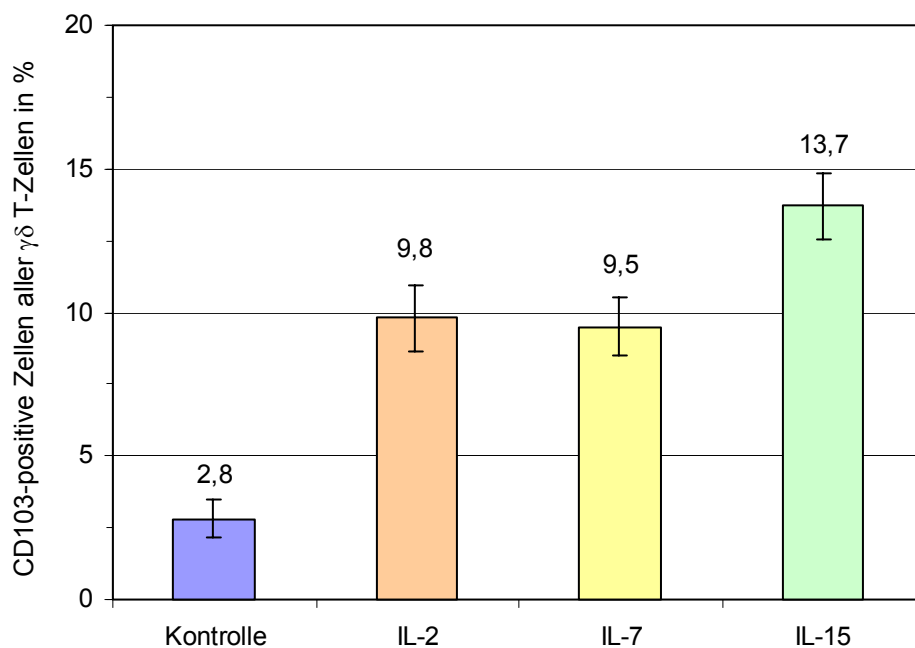
In Anwesenheit der Interleukine 2, 7 und 15 zeigten die  $\gamma\delta$  T-Zellen schon nach 1 bis 2 Tagen Inkubation eine eindeutige Zunahme der Zellgröße verbunden mit einer Veränderung der internen Zellstruktur, was sich durch die Zunahme des Seitwärtsstreulichtes dokumentieren ließ. Darüber hinaus wiesen die Ansätze nach 5 Tagen eine deutlich höhere Zelldichte auf. Im Durchlichtmikroskop konnten einzelne Zellhaufen am Boden der Mikrotiterplatte beobachtet werden, was für eine Proliferation der Zellen sprach. Einen Hinweis auf den verstärkten Stoffwechsel der Zellen bzw. deren Proliferation ergab auch die pH-Wert-Analyse des Mediums. Durch die sich anreichernden sauren Stoffwechselprodukte der Zellen nach längerer Inkubation (> 5 Tage) mit probeweise hoher Zelldichte ( $5 \times 10^6$  Zellen je ml) zeigten nur die Ansätze mit IL-2, IL-7 und IL-15 einen Farbumschlag des pH-Wert-Indikators Phenolrot, der dem Medium zugesetzt worden war.



**Abbildung 4.5:** Zunahme der Zellgröße und Granularität humaner  $\gamma\delta$  T-Zellen nach 5 und 10 Tagen Inkubation in Anwesenheit der Interleukine 2, 7 und 15. Der Blastenanteil der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten, welcher über das gemessene Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht von den übrigen Lymphozyten abgrenzen ließ, wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 5 unabhängigen Messungen. Die  $\gamma\delta$  T-Zellen der Kontrolle konnten aufgrund ihrer begrenzten Viabilität nur nach 5 Tagen analysiert werden, eine Messung nach 10 Tagen war nicht möglich.

Die aktivierten  $\gamma\delta$  T-Zellen, welche sich durch eine Zunahme an Zellgröße und Granularität von den übrigen „ruhenden“ Lymphozyten unterschieden, konnten durchflusszytometrisch abgegrenzt werden. Der Anteil dieser als Blasten bezeichneten  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten an der Lymphozyten-Gesamtpopulation nahm nach 5 Tagen Inkubation in Anwesenheit der Interleukine 2, 7 und 15 verglichen mit der Kontrolle signifikant zu ( $p < 0,01$ ).

Die durchflusszytometrische Analyse des Oberflächenantigens  $\alpha^E\beta_7$  auf den inkubierten  $\gamma\delta$  T-Zellen führte zu folgenden Ergebnissen.



**Abbildung 4.6:** Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  auf humanen  $\gamma\delta$  T-Zellen nach 5 Tagen Inkubation in Anwesenheit von IL-2, IL-7 und IL-15. Die Zellen wurden mit PE-markierten anti-CD103-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 5 (bzw. 7 bei der Kontrolle) unabhängigen Messungen.

Alle drei Interleukine führten zu einer signifikanten Steigerung der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression. Die Ansätze mit IL-2 und IL-7 steigerten die Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression jeweils auf etwa 10 % und zeigten untereinander keinen statistisch signifikanten Unterschied. Die Ansätze mit IL-15 hatten mit durchschnittlich 13,7 % den relativ höchsten Anteil an Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierenden Zellen. Nach dem Mann-Whitney-U-Test war der Unterschied zu den Ansätzen mit IL-2 und IL-7 mit einer asymptotischen Signifikanz von  $p = 0,047$  bzw. einer exakten Signifikanz von  $p = 0,056$  grenzwertig signifikant.

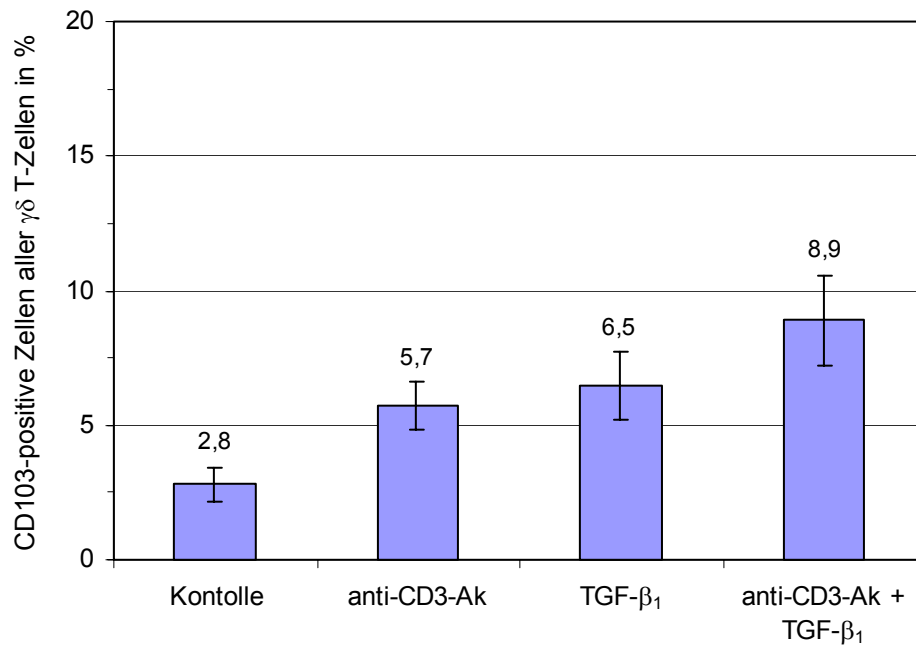
Mann-Whitney-U-Test		asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	exakte Signifikanz (2 x einseitig)
Stichprobe 1	Stichprobe 2		
Kontrolle	IL-2	0,007	0,005
	IL-7	0,007	0,005
	IL-15	0,004	0,003
IL-2	IL-7	0,754	0,841
IL-15	IL-2	0,047	0,056
	IL-7	0,047	0,056

**Tabelle 4.1:** *Statistische Auswertung der in Abbildung 4.6 dargestellten Messergebnisse. Die unabhängigen Stichproben wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests paarweise analysiert und sowohl die asymptotische als auch die exakte Signifikanz ausgegeben. Den Stichproben liegen jeweils 5 (bzw. 7 bei der Kontrolle) unabhängige Messungen zugrunde.*

#### 4.3.4 Inkubation der $\gamma\delta$ T-Zellen in Anwesenheit von TGF- $\beta_1$ und anti-CD3-Antikörper

In Anwesenheit von TGF- $\beta_1$  und anti-CD3-Ak zeigten die inkubierten  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten nach 5 Tagen im Vergleich zur Kontrolle (4,4 %) keine signifikante Zunahme an Zellgröße oder Granularität. Der mittlere Blastenanteil aller  $\gamma\delta$  T-Zellen (N = 5) betrug nach 5 Tagen Inkubation in Anwesenheit von TGF- $\beta_1$  5,0 %, in Anwesenheit von anti-CD3-Ak 5,9 % und in Anwesenheit von TGF- $\beta_1$  kombiniert mit anti-CD3-Ak 6,9 %. Die Zellen verloren in Gegenwart von TGF- $\beta_1$  und anti-CD3-Ak genauso wie in der Kontrolle nach 6 bis 7 Tagen in Kultur ihre Viabilität.

In allen drei Ansätzen mit anti-CD3-Ak, TGF- $\beta_1$  und der gemeinsamen Anwesenheit von anti-CD3-Ak und TGF- $\beta_1$  wurde der Anteil an  $\alpha^E\beta_7$ -positiven  $\gamma\delta$  T-Zellen, verglichen mit der Kontrolle, signifikant gesteigert (s. Abbildung 4.7). Zwischen den einzelnen Ansätzen mit anti-CD3-Ak, TGF- $\beta_1$  und der Kombination aus anti-CD3-Ak und TGF- $\beta_1$  gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die Ergebnisse zeigten jedoch die Tendenz einer Steigerung der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression durch die Kombination der Stimulanzen anti-CD3-Ak und TGF- $\beta_1$  im Vergleich zu den Ansätzen mit den Einzelstimulationen. Hier kann ein synergistischer Effekt vorliegen.



**Abbildung 4.7:** Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  auf humanen  $\gamma\delta$  T-Zellen nach 5 Tagen Inkubation in Anwesenheit von anti-CD3-Ak und TGF- $\beta_1$ . Die Zellen wurden mit PE-markierten anti-CD103-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils 5 (bzw. 7 bei der Kontrolle) unabhängigen Messungen.

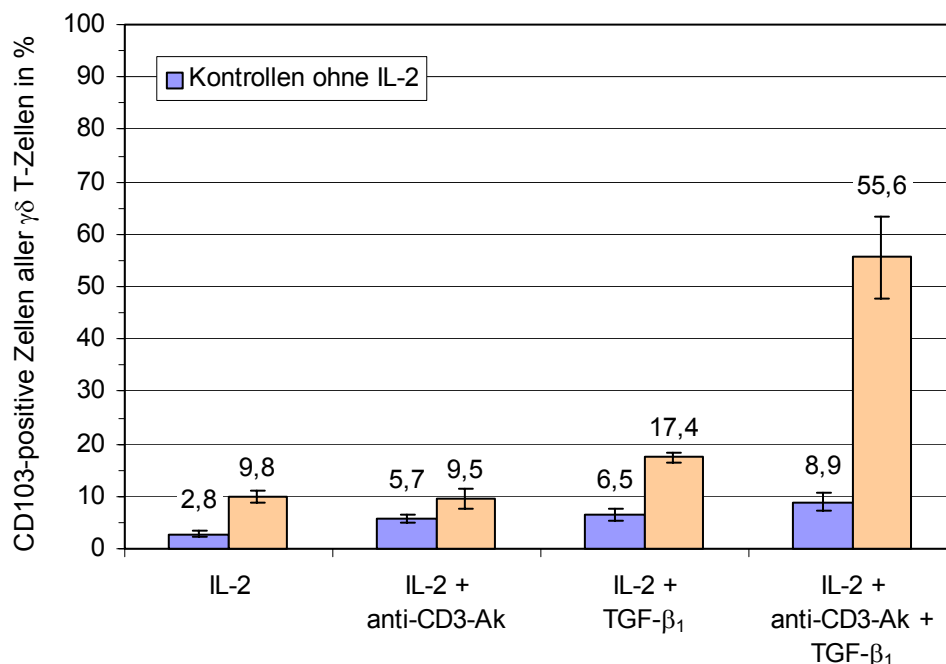
Mann-Whitney-U-Test		asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	exakte Signifikanz (2 x einseitig)
Stichprobe 1	Stichprobe 2		
Kontrolle	anti-CD3-Ak	0,012	0,010
	TGF- $\beta_1$	0,018	0,018
	anti-CD3-Ak + TGF- $\beta_1$	0,007	0,005
anti-CD3-Ak	TGF- $\beta_1$	0,753	0,841
anti-CD3-Ak + TGF- $\beta_1$	anti-CD3-Ak	0,251	0,310
	TGF- $\beta_1$	0,249	0,310

**Tabelle 4.2:** Statistische Auswertung der in Abbildung 4.7 dargestellten Messergebnisse. Die unabhängigen Stichproben wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests paarweise analysiert und sowohl die asymptotische als auch die exakte Signifikanz ausgegeben. Den Stichproben liegen jeweils 5 (bzw. 7 bei der Kontrolle) unabhängige Messungen zugrunde.

#### 4.3.5 Inkubation der $\gamma\delta$ T-Zellen in Anwesenheit der Interleukine 2, 7 und 15 kombiniert mit TGF- $\beta_1$ und anti-CD3-Antikörper

Die systematische Kombination der in Kapitel 4.3.2 vorgestellten Substanzen zeigte, dass in einigen Fällen die Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression, verglichen mit den unter 4.3.3 und 4.3.4 präsentierten Ergebnissen, noch weiter gesteigert werden konnte. Unter anderem wurden auch Kombinationen untersucht, bei denen die Einzelsubstanzen keinen messbaren Einfluss auf die Zellaktivität oder die Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression hatten. Beispielsweise wurde den verschiedenen Ansätzen IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  zugegeben, was jedoch zu keiner Beeinflussung der Ergebnisse führte und daher hier auch nicht dargestellt wird. Die als Einzelsubstanz ähnlich auf die Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression und die Viabilität der Zellen wirkenden Interleukine 2, 7 und 15 zeigten in der Kombination mit den Substanzen TGF- $\beta_1$  und anti-CD3-Ak jedoch recht unterschiedliche Ergebnisse, wie nachfolgend dargestellt werden soll.

##### 4.3.5.1 Interleukin-2 kombiniert mit TGF- $\beta_1$ und anti-CD3-Antikörper



**Abbildung 4.8:** Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  auf humanen  $\gamma\delta$  T-Zellen nach 5 Tagen Inkubation in Anwesenheit von IL-2, anti-CD3-Ak und TGF- $\beta_1$ . Die Zellen wurden mit PE-markierten anti-CD103-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Kontrollen enthalten die Stimulanzen der Ansätze jeweils ohne IL-2. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils 5 (bzw. 7 bei der Kontrolle von IL-2) unabhängigen Messungen.

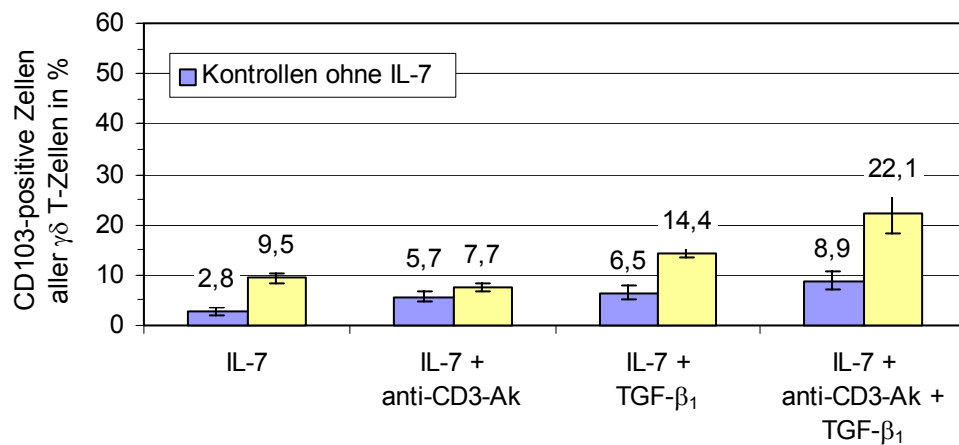
Gegenüber der Kontrolle ohne Stimulanzen (2,8 %) führten alle Stichproben mit IL-2 zu einer signifikanten Steigerung der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression. IL-2 kombiniert mit anti-CD3-Ak (9,5 %) erhöhte im Vergleich zu IL-2 ohne anti-CD3-Ak (9,8 %) die Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression nicht, obwohl der anti-CD3-Ak in Abwesenheit von IL-2 verglichen mit der Kontrolle zu einer signifikanten Steigerung der Antigen-Expression führte (s. Tabelle 4.2).

Die Kombination von IL-2 und TGF- $\beta_1$  zeigte verglichen mit der IL-2-Stimulation ohne TGF- $\beta_1$ , dass die zusätzliche Anwesenheit von TGF- $\beta_1$  die Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression von 9,8 % auf 17,4 % signifikant erhöhte. Diese Steigerung war etwa doppelt so hoch wie die, welche TGF- $\beta_1$  ohne IL-2 verglichen mit der Kontrolle bewirkte (2,8 % auf 6,5 %).

Der deutlichste Effekt auf die Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression wurde bei der Kombination aller drei Stimulanzen beobachtet. In Gegenwart von IL-2, anti-CD3-Ak und TGF- $\beta_1$  exprimierten nach 5 Tagen Inkubation durchschnittlich 55,6 % der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten das Integrin  $\alpha^E\beta_7$ . Die signifikante Steigerung der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression bei der Kombination aller drei Stimulanzen verglichen mit den übrigen in der Abbildung 4.8 aufgeführten Ansätzen kann als supraadditiv bezeichnet werden.

Mann-Whitney-U-Test		asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	exakte Signifikanz (2 x einseitig)
Stichprobe 1	Stichprobe 2		
ohne Stimulanzen	IL-2	0,007	0,005
anti-CD3-Ak	IL-2 + anti-CD3-Ak	0,127	0,222
TGF- $\beta_1$	IL-2 + TGF- $\beta_1$	0,009	0,008
anti-CD3-Ak + TGF- $\beta_1$	IL-2 + anti-CD3-Ak + TGF- $\beta_1$	0,009	0,008
IL-2	IL-2 + anti-CD3-Ak	0,917	1,000
	IL-2 + TGF- $\beta_1$	0,009	0,008
	IL-2 + anti-CD3-Ak + TGF- $\beta_1$	0,009	0,008
IL-2 + anti-CD3-Ak	IL-2 + TGF- $\beta_1$	0,009	0,008
IL-2 + anti-CD3-Ak + TGF- $\beta_1$	IL-2 + anti-CD3-Ak	0,009	0,008
	IL-2 + TGF- $\beta_1$	0,009	0,008

**Tabelle 4.3:** *Statistische Auswertung der in Abbildung 4.8 dargestellten Messergebnisse. Die unabhängigen Stichproben wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests paarweise analysiert und sowohl die asymptotische als auch die exakte Signifikanz ausgegeben. Den Stichproben liegen jeweils 5 unabhängige Messungen zugrunde.*

4.3.5.2 Interleukin-7 kombiniert mit TGF- $\beta_1$  und anti-CD3-Antikörper

**Abbildung 4.9:** Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  auf humanen  $\gamma\delta$  T-Zellen nach 5 Tagen Inkubation in Anwesenheit von IL-7, anti-CD3-Ak und TGF- $\beta_1$ . Die Zellen wurden mit PE-markierten anti-CD103-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Kontrollen enthalten die Stimulanzen der Ansätze jeweils ohne IL-7. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils 5 (bzw. 7 bei der Kontrolle von IL-7) unabhängigen Messungen.

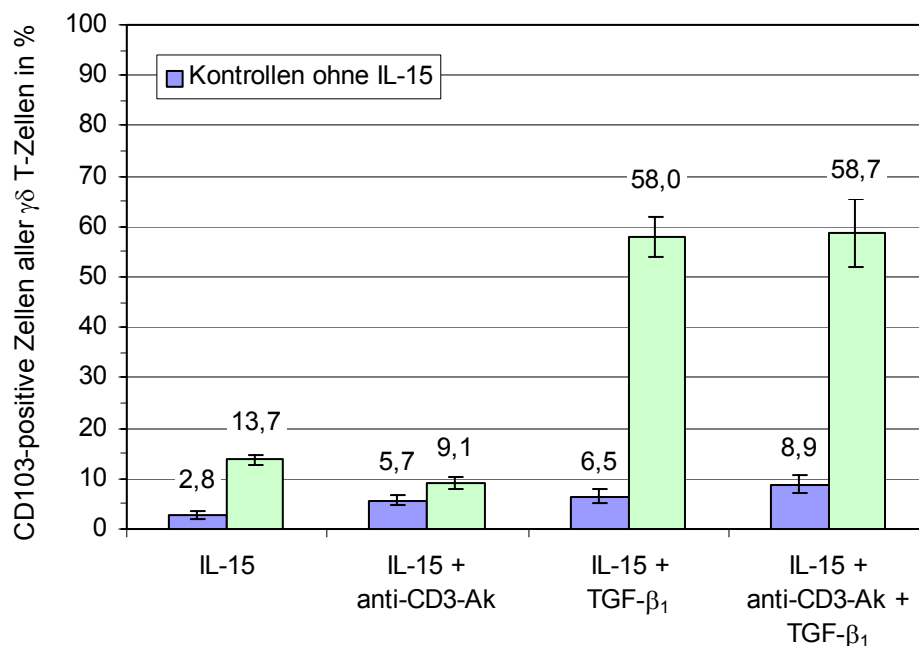
Mann-Whitney-U-Test		asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	exakte Signifikanz (2 x einseitig)
Stichprobe 1	Stichprobe 2		
ohne Stimulanzen	IL-7	0,007	0,005
anti-CD3-Ak	IL-7 + anti-CD3-Ak	0,251	0,310
TGF- $\beta_1$	IL-7 + TGF- $\beta_1$	0,009	0,008
anti-CD3-Ak + TGF- $\beta_1$	IL-7 + anti-CD3-Ak + TGF- $\beta_1$	0,016	0,016
IL-7	IL-7 + anti-CD3-Ak	0,142	0,151
	IL-7 + TGF- $\beta_1$	0,009	0,008
	IL-7 + anti-CD3-Ak + TGF- $\beta_1$	0,047	0,056
IL-7 + anti-CD3-Ak	IL-7 + TGF- $\beta_1$	0,009	0,008
IL-7 + anti-CD3-Ak + TGF- $\beta_1$	IL-7 + anti-CD3-Ak	0,016	0,016
	IL-7 + TGF- $\beta_1$	0,142	0,151

**Tabelle 4.4:** Statistische Auswertung der in Abbildung 4.9 dargestellten Messergebnisse. Die unabhängigen Stichproben wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests paarweise analysiert und sowohl die asymptotische als auch die exakte Signifikanz ausgegeben. Den Stichproben liegen jeweils 5 unabhängige Messungen zugrunde.



In allen Ansätzen mit IL-7 war nach 5 Tagen Inkubation der Anteil an Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierenden Zellen verglichen mit der Kontrolle ohne Stimulanzen signifikant höher. Die Anwesenheit von anti-CD3-Ak bei den durch IL-7 stimulierten Zellen führte zu einer leichten Reduktion der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression (von 9,5 % auf 7,7 %) ähnlich wie auch bei den Ansätzen mit IL-2, was jedoch ebenfalls nicht statistisch signifikant war. Die signifikante Steigerung der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression durch Zugabe von TGF- $\beta_1$  (von 9,5 % auf 14,4 %) fiel bei den Ansätzen mit IL-7 im Vergleich zu IL-2 etwas geringer aus. Ein deutlicher Unterschied bestand bei der Kombination des Interleukins mit den beiden Stimulanzen anti-CD3-Ak und TGF- $\beta_1$ . Im Gegensatz zu den Ansätzen mit IL-2 wurde bei den IL-7-Ansätzen durch den Zusatz von anti-CD3-Ak und TGF- $\beta_1$  zu der Interleukin-Stichprobe die Antigen-Expression nur grenzwertig signifikant von 9,5 % auf 22,1 % erhöht.

#### 4.3.5.3 Interleukin-15 kombiniert mit TGF- $\beta_1$ und anti-CD3-Antikörper



**Abbildung 4.10:** Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  auf humanen  $\gamma\delta$  T-Zellen nach 5 Tagen Inkubation in Anwesenheit von IL-15, anti-CD3-Ak und TGF- $\beta_1$ . Die Zellen wurden mit PE-markierten anti-CD103-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Kontrollen enthalten die Stimulanzen der Ansätze jeweils ohne IL-15. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils 5 (bzw. 7 bei der Kontrolle von IL-15) unabhängigen Messungen.

Alle IL-15-Ansätze wiesen nach 5 Tagen Inkubation eine gegenüber der Kontrolle ohne Stimulanzen signifikant höhere Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression auf. Die Kombination von IL-15 mit anti-CD3-Ak zeigte im Vergleich zu der Interleukin-Stimulation ohne anti-CD3-Ak wie bei den Interleukinen 2 und 7 eine Verringerung der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression (von 13,7 % auf 9,1 %). Im Gegensatz zu den entsprechenden Stichproben bei IL-2 und IL-7 war der Unterschied bei IL-15 mit 4,6 Prozentpunkten statistisch signifikant ( $p = 0,016$ ).

Die in Anwesenheit von IL-15 und TGF- $\beta_1$  stimulierten Zellen zeigten eine vergleichbare Steigerung der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression wie bei der Kombination von IL-2, anti-CD3-Ak und TGF- $\beta_1$ . 58,0 % aller  $\gamma\delta$  T-Zellen exprimierten in Anwesenheit von IL-15 und TGF- $\beta_1$  nach 5 Tagen Inkubation das Integrin  $\alpha^E\beta_7$ , was einer Steigerung um 55,2 Prozentpunkte verglichen mit der Kontrolle ohne Stimulanzen entsprach. Die zusätzliche Anwesenheit von anti-CD3-Ak führte zu keiner eindeutigen Steigerung der Antigen-Expression, der Unterschied zwischen 58,0 % und 58,7 % war nicht signifikant.

Mann-Whitney-U-Test		asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	exakte Signifikanz (2 x einseitig)
Stichprobe 1	Stichprobe 2		
ohne Stimulanzen	IL-15	0,004	0,003
anti-CD3-Ak	IL-15 + anti-CD3-Ak	0,076	0,095
TGF- $\beta_1$	IL-15 + TGF- $\beta_1$	0,009	0,008
anti-CD3-Ak + TGF- $\beta_1$	IL-15 + anti-CD3-Ak + TGF- $\beta_1$	0,009	0,008
IL-15	IL-15 + anti-CD3-Ak	0,016	0,016
	IL-15 + TGF- $\beta_1$	0,009	0,008
	IL-15 + anti-CD3-Ak + TGF- $\beta_1$	0,009	0,008
IL-15 + anti-CD3-Ak	IL-15 + TGF- $\beta_1$	0,009	0,008
IL-15 + anti-CD3-Ak + TGF- $\beta_1$	IL-15 + anti-CD3-Ak	0,009	0,0008
	IL-15 + TGF- $\beta_1$	0,834	0,841

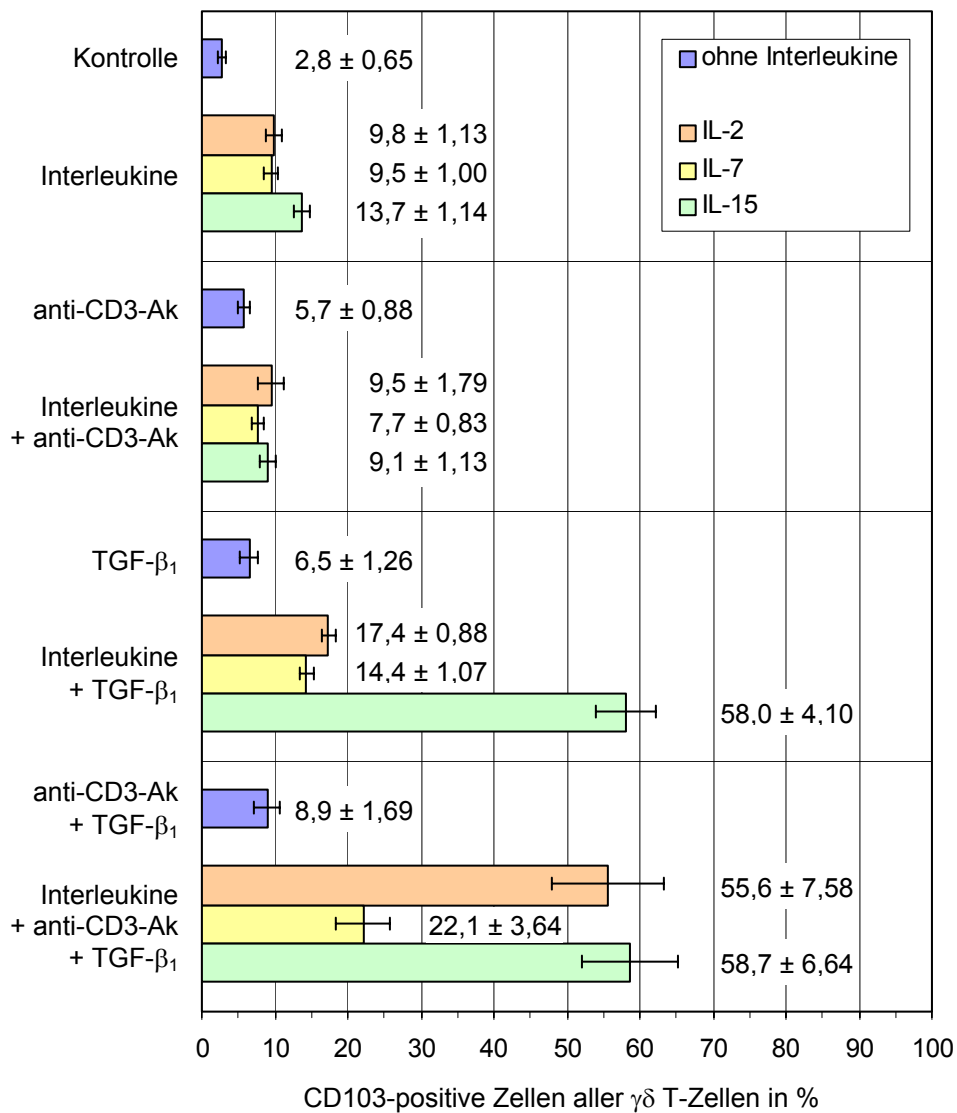
**Tabelle 4.5:** *Statistische Auswertung der in Abbildung 4.10 dargestellten Messergebnisse. Die unabhängigen Stichproben wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests paarweise analysiert und sowohl die asymptotische als auch die exakte Signifikanz ausgegeben. Den Stichproben liegen jeweils 5 unabhängige Messungen zugrunde.*

#### 4.3.6 Zusammenfassung der nach 5 Tagen Inkubation gemessenen Ergebnisse

Von den 14 verschiedenen untersuchten Stimulanzen (s. 4.3.2) beeinflussten 5 der Stimulanzen die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$ . Die nach 5 Tagen Inkubation analysierten  $\gamma\delta$  T-Zellen zeigten in 3 verschiedenen Ansätzen eine Steigerung der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression auf über 50 %. Diese *in vitro* gemessene Integrin-Expression ist mit derjenigen, welche bei den bronchoalveolär lavagierten  $\gamma\delta$  T-Zellen von Patienten mit fibrosierenden Lungenkrankheiten gemessen wurde, vergleichbar. Damit war ein Ziel erreicht, Zytokine und Stimulanzen zu finden, die auch im Mikromilieu der Lunge bei Patienten mit fibrosierenden Lungenerkrankungen zu den hohen Anteilen an  $\alpha^E\beta_7$ -positiven  $\gamma\delta$  T-Zellen beitragen könnten. Insbesondere das Zytokin TGF- $\beta_1$  dürfte hierbei eine Rolle spielen.

Ohne TGF- $\beta_1$  (s. Abbildung 4.11) lag die Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression bei allen Ansätzen, außer bei der Stichprobe mit IL-15, unter 10 %. Die Stichprobe mit IL-15 wies eine durchschnittliche Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression von 13,7 % auf. Die Zugabe von TGF- $\beta_1$  erhöhte in allen Ansätzen den Anteil  $\alpha^E\beta_7$ -exprimierender  $\gamma\delta$  T-Zellen. Die Kombination von TGF- $\beta_1$  mit anti-CD3-Ak führte bei allen Ansätzen zu einer Verstärkung der Wirkung von TGF- $\beta_1$  bezüglich der  $\alpha^E\beta_7$ -Expression, wohingegen sich die  $\alpha^E\beta_7$ -Expression bei den Interleukin-Stimulationen ohne TGF- $\beta_1$  durch die Anwesenheit von anti-CD3-Ak verringerte. Bei IL-15 war dieser Effekt signifikant.

IL-7 hatte verglichen mit den beiden anderen Interleukinen in allen Ansätzen die geringste stimulatorische Wirkung bzgl. der Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$ . Kombiniert mit anti-CD3-Ak und TGF- $\beta_1$  wurde mit IL-7 eine maximale Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression von durchschnittlich 22,1 % erreicht. Sowohl mit IL-2 als auch mit IL-15 konnten in Anwesenheit von anti-CD3-Ak und TGF- $\beta_1$  nach 5 Tagen Inkubation Antigen-Expressionen von 55,6 % bzw. 58,7 % gemessen werden. Bei IL-15 wurde kombiniert mit TGF- $\beta_1$  jedoch auch ohne die zusätzliche Stimulation mit anti-CD3-Ak eine durchschnittliche  $\alpha^E\beta_7$ -Expression von 58,0 % erreicht. Bei der entsprechenden Stichprobe mit IL-2 wiesen dagegen lediglich 17,4 % der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  auf.

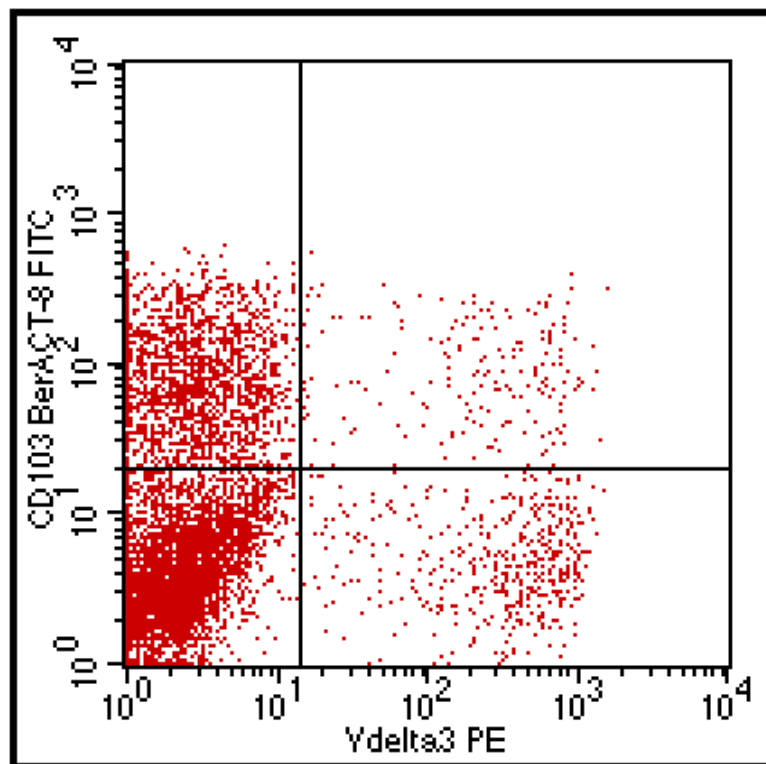


**Abbildung 4.11:** Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  auf humanen  $\gamma\delta$  T-Zellen nach 5 Tagen Inkubation in Gegenwart von IL-2, IL-7, IL-15, anti-CD3-Ak und TGF- $\beta_1$ . Die Zellen wurden mit PE-markierten anti-CD103-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils 5 (bzw. 7 bei der Kontrolle) unabhängigen Messungen.

#### 4.3.7 Analyse der $\gamma\delta$ T-Zelluntergruppen nach 5 Tagen Inkubation

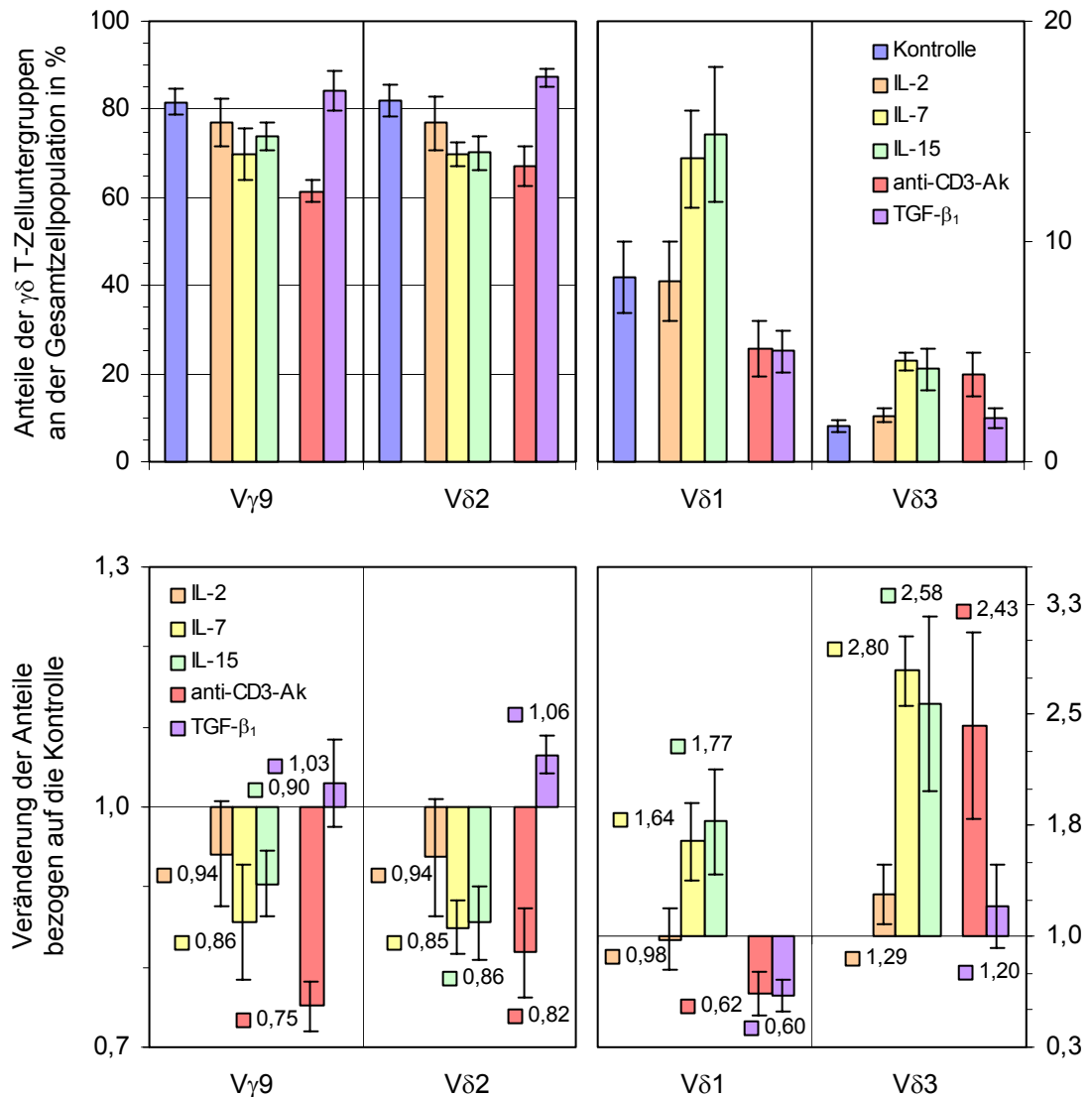
Neben der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression wurden auch die  $\gamma\delta$  T-Zelluntergruppen V $\gamma$ 9, V $\delta$ 1 V $\delta$ 2 und V $\delta$ 3 nach 5 Tagen Inkubation in Anwesenheit der verschiedenen Stimulanzen analysiert. Die Verhältnisse direkt nach der Isolierung und nach 5 Tagen Inkubation in Abwesenheit von Stimulanzen wurden in Kapitel 4.3.1 dargestellt. Vor der Inkubation exprimierten die untersuchten Untergruppen zu gleichen Anteilen das Integrin  $\alpha^E\beta_7$ . Es war zu analysieren, ob die Untergruppen unterschiedlich auf die Stimulanzen reagierten und ob sie sich nach 5 Tagen Inkubation in ihren Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expressionen unterschieden.

Bei allen Ansätzen exprimierten nach 5 Tagen Inkubation die einzelnen  $\gamma\delta$  T-Zelluntergruppen zu gleichen Anteilen das Integrin  $\alpha^E\beta_7$ . Kein Subtyp zeichnete sich durch eine besonders hohe oder besonders niedrige Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  aus.



**Abbildung 4.12:** Messung des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  auf humanen  $\gamma\delta$  T-Zellen nach 5 Tagen Inkubation in Anwesenheit von IL-15 und TGF- $\beta_1$ . Die Zellen wurden mit FITC-markierten anti-CD103-Antikörpern und PE markierten anti-V $\delta$ 3-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die dargestellte Dot-Plot-Analyse mit eingeblendetem Quadranten-Gitter zeigte (hier am Beispiel von V $\delta$ 3-positiven und -negativen Zellen), dass die  $\gamma\delta$  T-Zelluntergruppen sich in der Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  nicht voneinander unterschieden.

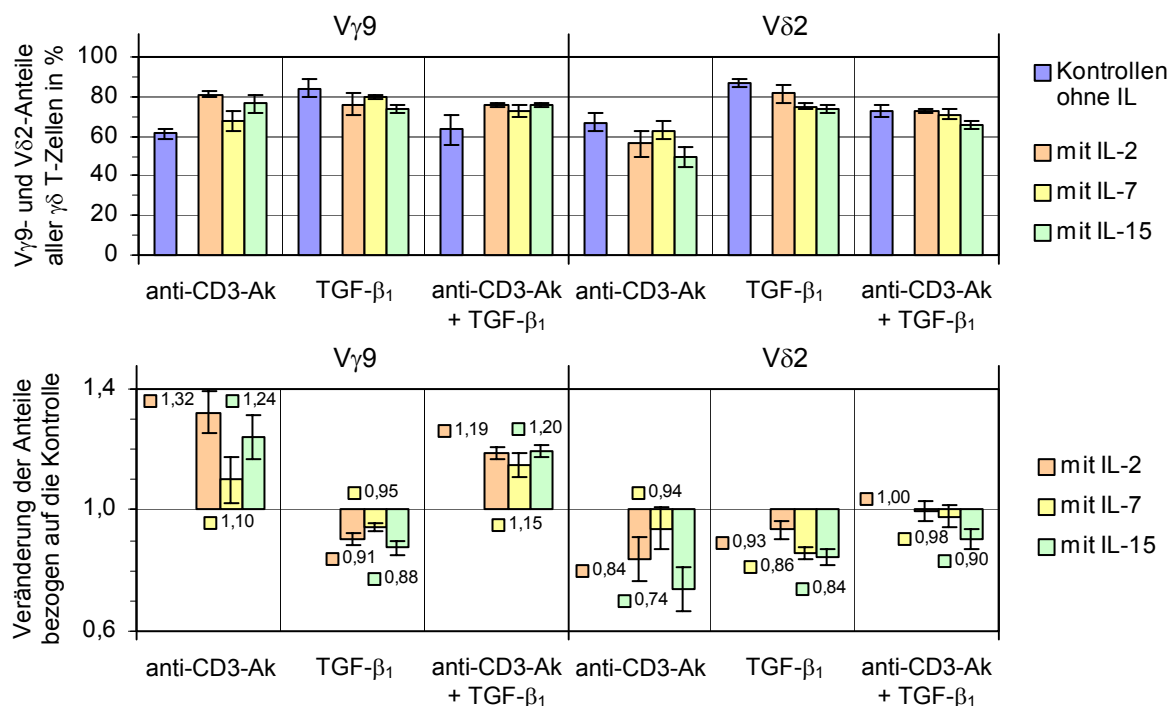
Die Bestimmung der Anteile der  $\gamma\delta$  T-Zelluntergruppen an der Gesamtpopulation zeigte jedoch, dass das Verhältnis der Untergruppen zueinander durch die zugesetzten Stimulanzen in den einzelnen Ansätzen verändert wurde.



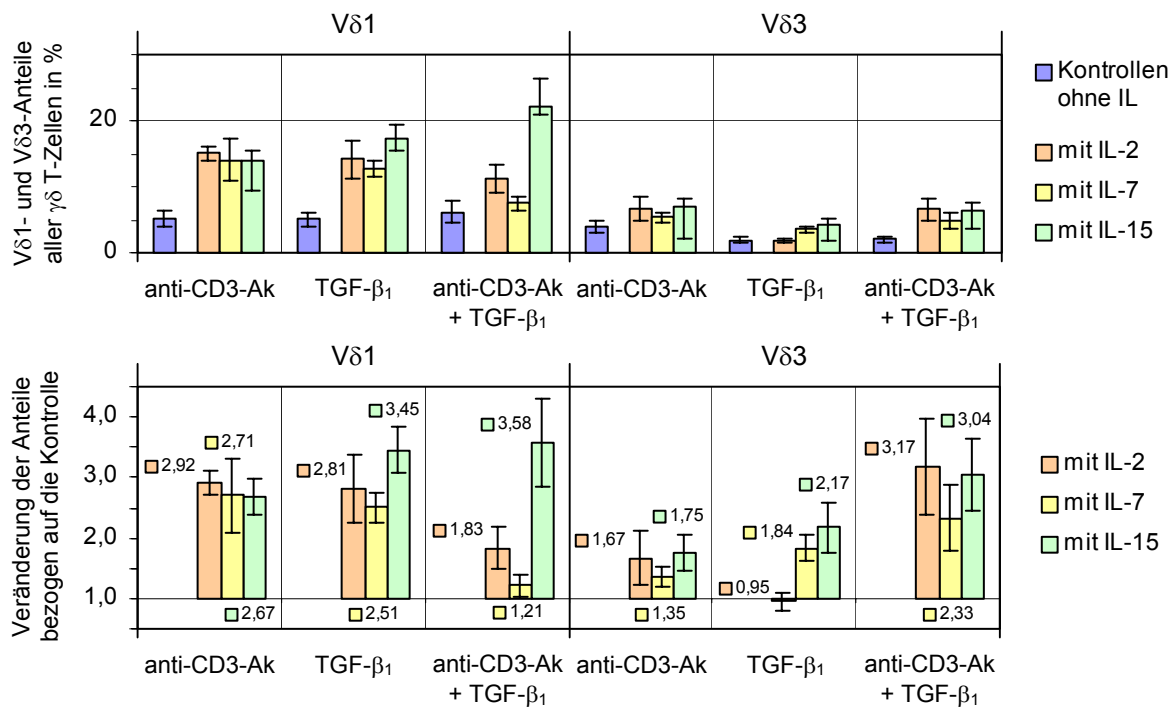
**Abbildung 4.13:** Anteil der  $\gamma\delta$  T-Zelluntergruppen V $\gamma$ 9, V $\delta$ 1, V $\delta$ 2 und V $\delta$ 3 an der Gesamtpopulation humaner aus venösem Vollblut isolierter  $\gamma\delta$ T-Zellen nach 5 Tagen Inkubation in Anwesenheit von IL-2, IL-7, IL-15, anti-CD3-Ak und TGF- $\beta_1$ . Die Zellen wurden mit FITC- und PE-markierten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die in den Diagrammen dargestellten Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils 5 unabhängigen Messungen. In den oberen Diagrammen sind die  $\gamma\delta$  T-Zellsubtypen als prozentualer Anteil an der Gesamtpopulation, in den unteren Diagrammen als relative Veränderung des Anteils bezogen auf die Kontrolle dargestellt.

In Anwesenheit der Interleukine IL-7 und IL-15 wurde das Verhältnis der Untergruppen von V $\gamma$ 9 und V $\delta$ 2 zu Gunsten der Untergruppen V $\delta$ 1 und V $\delta$ 3 verschoben. Im Vergleich zur

Kontrolle verringerte sich nach 5 Tagen Inkubation der  $V\gamma 9/V\delta 2$ -Anteil von 82 % auf 70 % (IL-7) bzw. auf 74 %  $V\gamma 9$  / 70 %  $V\delta 2$  T-Zellen (IL-15). Der  $V\delta 1$ -Anteil nahm von 8,4 % auf 14,9 % (IL-15) und der  $V\delta 3$ -Anteil von 1,6 % auf 4,6 % (IL-7) zu. Statistisch signifikant war die Abnahme des  $V\delta 2$ -Anteils durch IL-7 ( $p_{\text{exakt}} = 0,035$ ) und die Zunahme des  $V\delta 1$ -Anteils durch IL-15 ( $p_{\text{exakt}} = 0,018$ ). Beim  $V\delta 3$ -Subtyp führte sowohl IL-7 als auch IL-15 zu einer hochsignifikanten Steigerung des Untergruppenanteils ( $p_{\text{exakt}} = 0,004$ ). Auf die Subtypen  $V\gamma 9$ ,  $V\delta 2$  und  $V\delta 3$  hatte der anti-CD3-Ak einen ähnlichen Effekt wie die Interleukine IL-7 und IL-15. Der  $V\gamma 9$ -Anteil wurde, deutlicher als bei den Interleukinen, hochsignifikant ( $p_{\text{exakt}} = 0,001$ ) von 82 % auf 61,4 % gesenkt. Interessanterweise wurde der  $V\delta 1$ -Anteil in Anwesenheit von anti-CD3-Ak nicht wie bei IL-7 und IL-15 erhöht, sondern von 8,4 % auf 5,2 % gesenkt. Eine vergleichbare  $V\delta 1$ -supprimierende Wirkung hatte auch  $TGF-\beta_1$ , die jedoch ebenfalls nicht signifikant war. IL-2 hatte ohne Ko-Stimulanzen keinen Einfluss auf die Verteilung der  $\gamma\delta$  T-Zellsubtypen.



**Abbildung 4.14:** Anteil der  $\gamma\delta$  T-Zelluntergruppen  $V\gamma 9$  und  $V\delta 2$  an der Gesamtpopulation humaner aus venösem Vollblut isolierter  $\gamma\delta$  T-Zellen nach 5 Tagen Inkubation in Anwesenheit von IL-2, IL-7, IL-15 kombiniert mit anti-CD3-Ak und  $TGF-\beta_1$ . Die Zellen wurden mit FITC- und PE-markierten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die in den Diagrammen dargestellten Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils 5 unabhängigen Messungen. In den oberen Diagrammen sind die  $\gamma\delta$  T-Zellsubtypen als prozentualer Anteil an der Gesamtpopulation, in den unteren Diagrammen als relative Veränderung des Anteils bezogen auf die jeweilige Kontrolle ohne Interleukin dargestellt.



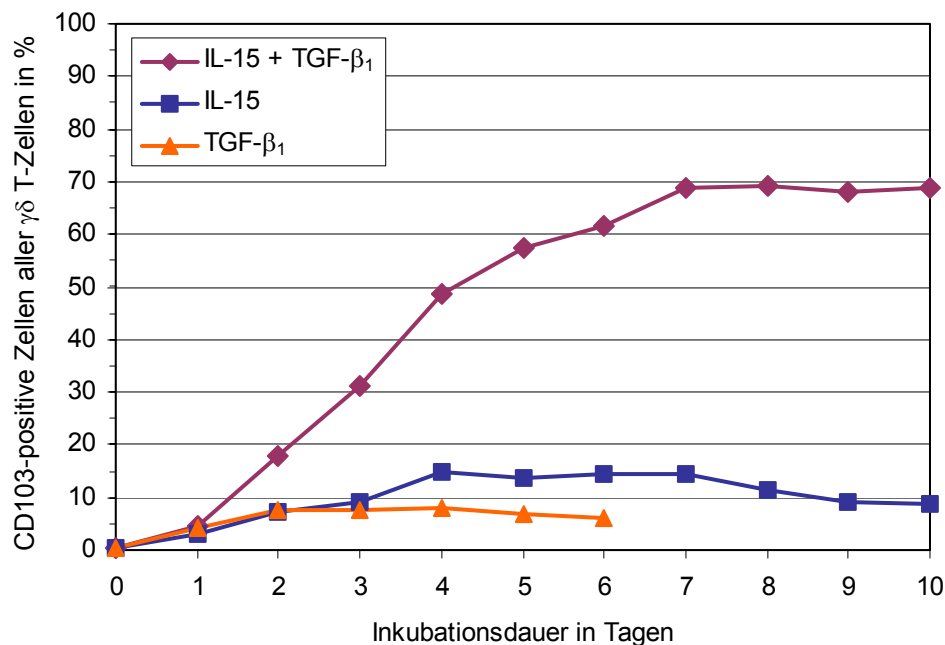
**Abbildung 4.15:** Anteil der  $\gamma\delta$  T-Zelluntergruppen Vδ1 und Vδ3 an der Gesamtpopulation humaner aus venösem Vollblut isolierter  $\gamma\delta$  T-Zellen nach 5 Tagen Inkubation in Anwesenheit von IL-2, IL-7, IL-15 kombiniert mit anti-CD3-Ak und TGF- $\beta_1$ . Die Zellen wurden mit FITC- und PE-markierten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die in den Diagrammen dargestellten Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils 5 unabhängigen Messungen. In den oberen Diagrammen sind die  $\gamma\delta$  T-Zellsubtypen als prozentualer Anteil an der Gesamtpopulation, in den unteren Diagrammen als relative Veränderung des Anteils bezogen auf die jeweilige Kontrolle ohne Interleukin dargestellt.

Die V $\gamma$ 9- und Vδ1-supprimierende Wirkung des anti-CD3-Ak wurde durch die Kombination mit den Interleukinen 2, 7 und 15 aufgehoben. Bei der Vδ2-Subpopulation hingegen addierten sich die Vδ2-supprimierenden Wirkungen der Interleukine und des anti-CD3-Ak, wobei die Kombination von IL-15 mit anti-CD3-Ak zu einer maximalen Verringerung des Vδ2-Anteils von 82,0 % auf 49,9 % führte ( $p_{\text{exakt}} = 0,003$ ). IL-2 beeinflusste in Abwesenheit von anti-CD3-Ak und TGF- $\beta_1$  den Vδ1-Anteil nicht. Interessanterweise führte die Kombination von IL-2 mit anti-CD3-Ak oder TGF- $\beta_1$  zu einer Zunahme des Vδ1-Anteils und nicht zu einer Abnahme des Vδ1-Anteils, wie dies ohne IL-2 bei anti-CD3-Ak und TGF- $\beta_1$  beobachtet wurde. Die Steigerung des Vδ1-Anteils von 8,4 % auf 15,1 % (IL-2 + anti-CD3-Ak) bzw. auf 14,1 % (IL-2 + TGF- $\beta_1$ ) war jeweils signifikant ( $p_{\text{exakt}} = 0,030$  bzw.  $p_{\text{exakt}} = 0,018$ ). Der Anteil an Vδ1 Zellen variierte zwischen 5,0 % (TGF- $\beta_1$ ) und 22,1 % (IL-15 + anti-CD3-Ak + TGF- $\beta_1$ ). Die Vδ3 Zellen stellten stets die kleinste Fraktion mit Untergruppenanteilen zwischen 1,6 % (Kontrolle ohne Stimulanzen) und 6,9 % (IL-15 + anti-CD3-Ak) dar.



#### 4.4 Die Expression des Integrins $\alpha^E\beta_7$ im Zeitverlauf

Bisher wurde die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  nach 5 Tagen Inkubation gemessen. Es wurde festgestellt, dass die Anwesenheit von IL-15 zusammen mit TGF- $\beta_1$  den Anteil Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierender  $\gamma\delta$  T-Zellen nach 5 Tagen Inkubation von 1,8 % auf 58,0 % steigen ließ. Ob ähnliche hohe Anteile bereits nach kürzerer Inkubationszeit erreicht werden, sollte nun untersucht werden? Ebenso war von Interesse, ob sich der Anteil an Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierenden  $\gamma\delta$  T-Zellen bei längerer Inkubationszeit weiter erhöht? Eine Analyse der Integrin-Expression über 5 Tage hinaus war nur in Anwesenheit der Interleukine IL-2, IL-7 oder IL-15 möglich, da ohne diese Interleukine die  $\gamma\delta$  T-Zellen nach 6 bis 7 Tagen in Kultur ihre Viabilität verloren. Exemplarisch für die Kinetik des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  auf humanen  $\gamma\delta$  T-Zellen wurden die Ansätze mit IL-15, TGF- $\beta_1$  und der Kombination dieser beiden Zytokine bis zum 10. Tag in Kultur analysiert. Die TGF- $\beta_1$ -Ansätze konnten in Abwesenheit von IL-15 nur bis zum 6. Tag in Kultur analysiert werden.



**Abbildung 4.16:** Expression des Rezeptors  $\alpha^E\beta_7$  auf humanen  $\gamma\delta$  T-Zellen von Tag 0 bis Tag 10 in Anwesenheit von IL-15 und TGF- $\beta_1$ . Die Zellen wurden mit PE-markierten anti-CD103-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte von jeweils 2 unabhängigen Messreihen.

Bereits nach einem Tag in Kultur zeigte sich bei den 3 untersuchten Ansätzen ein Anstieg der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression auf etwa 5 %. Ab dem 2. Tag wiesen die Ansätze mit IL-15 und TGF- $\beta_1$  eine relativ stärkere Zunahme der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression verglichen mit den beiden anderen Messreihen auf. Der Anteil der Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierenden  $\gamma\delta$  T-Zellen nahm in Anwesenheit von IL-15 und TGF- $\beta_1$  bis zum 7. Tag kontinuierlich zu und blieb bis zum 10. Tag bei dem nach 7 Tagen Inkubation erreichten Maximum von 69,0 %. Der nach 5 Tagen gemessene Anteil an  $\alpha^E\beta_7$ -positiven Zellen entsprach mit 57,4 % dem in den vorherigen Versuchen bestimmten Mittelwert. In Anwesenheit von IL-15 ohne TGF- $\beta_1$  wurde eine maximale Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  bereits nach 4 Tagen erreicht, wobei der Anteil an Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierenden  $\gamma\delta$  T-Zellen bis zum 7. Tag bei etwa 15 % konstant blieb und dann bis zum 10. Tag auf 9 % abfiel. In Gegenwart von TGF- $\beta_1$  stieg die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  nach dem 2. Tag nicht weiter an. Der nach 2 Tagen Inkubation erreichte Anteil von 7,5 % fiel bis zum 6. Tag auf 6,0 % ab.

Das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  benötigt auf humanen  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten nach entsprechender Stimulation – zumindest *in vitro* und nach positiver magnetischer Zellseparation – zwischen 1 und 7 Tage, um exprimiert zu werden. Es gab  $\gamma\delta$  T-Zellen, die das Integrin relativ schnell exprimierten, so dass sie schon nach einem Tag eindeutig als CD103-positiv identifiziert werden konnten. In Anwesenheit von IL-15 und TGF- $\beta_1$  zeigte der bis zum 7. Tag steigende Anteil an CD103-positiven Zellen, dass es auch  $\gamma\delta$  T-Zellen gab, die erst nach 7 Tagen Inkubation und Stimulation das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierten.

## 4.5 Analyse der Zellproliferation mit Bromodeoxyuridin (BrdU)

### 4.5.1 Effekt von Zytokinen

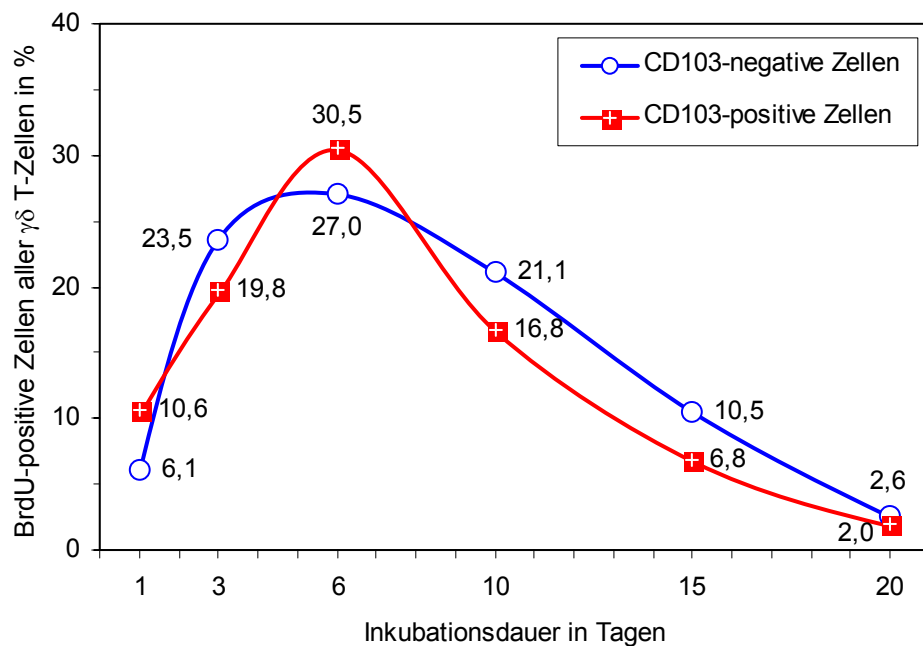
In Kapitel 4.3.3 wurde bereits erwähnt, dass nach einigen Tagen Inkubation in Anwesenheit der Interleukine 2, 7 und 15 Zellhaufen am Boden der Mikrotiterplatte im Durchlichtmikroskop beobachtet werden konnten. Diese deuteten auf eine Proliferation der  $\gamma\delta$  T-Zellen in Anwesenheit der Interleukine hin. Ob alle oder nur bestimmte  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten durch die Interleukine stimuliert und zur Proliferation angeregt wurden, war bisher nicht bekannt. Im Zusammenhang mit der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression stellte sich die Frage, ob die  $\alpha^E\beta_7$ -positiven

Zellen bei entsprechender Stimulation eine gesteigerte Proliferation aufwiesen. Es wäre denkbar, dass bei der Stimulation mit IL-15 und TGF- $\beta_1$  selektiv die Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierenden  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten proliferierten, wodurch ihr Anteil an der Gesamtpopulation entsprechend zunehmen würde.

Bei den Messungen wurden die  $\gamma\delta$  T-Zellen nach der BrdU-Inkubation in einigen Ansätzen zusätzlich mit anti-CD103-Ak inkubiert, um mögliche Unterschiede im Proliferationsverhalten von CD103-positiven und CD103-negativen Zellen darzustellen. Der Anteil BrdU-positiver Zellen ist abhängig von der BrdU-Inkubationsdauer. Nach längerer Inkubation würden nahezu alle Zellen BrdU in ihren Zellkern eingebaut haben und relative Unterschiede kaum mehr feststellbar sein. Bei sehr kurzer Inkubationsdauer würde ein kurzzeitiges Stören des Mikromilieus der Zellkultur z. B. durch Aufwirbeln der Zellen und ggf. Abkühlen in der Sterilbank in einem höheren Maße ins Gewicht fallen. Es wurde eine Inkubationszeit von zwei Stunden gewählt, bei der Anteile proliferierender Zellen von bis zu 30 % gemessen wurden. In erster Linie sollte festgestellt werden, ob sich die CD103-positiven und die CD103-negativen Zellen hinsichtlich ihrer BrdU-Aufnahme voneinander unterscheiden.

Die Zellen wurden bis zum 20. Tag in Kultur analysiert. In Anwesenheit von IL-15 und TGF- $\beta_1$  waren die isolierten  $\gamma\delta$  T-Zellen über 10 Tage ohne auffallenden Zellverlust zu messen. Dieses stimmte mit den bei der Analyse der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression im Zeitverlauf (Kapitel 4.4) beobachteten Ergebnissen überein. Die weitere Untersuchung der Zellen bis zum 20. Tag in Kultur zeigte, dass in Anwesenheit von IL-15 und TGF- $\beta_1$  ab dem 10. Tag die Anzahl der lebendigen messbaren Zellen abnahm. Am 20. Tag waren nur noch wenige viable Zellen zu messen. Es können keine exakten quantitativen Angaben über den Zellverlust gemacht werden, da auf die Zelldichte in Kultur lediglich indirekt über die durchflusssytometrisch gezählten Zellen je Sekunde geschlossen werden konnte.

Bei dem ab dem 10. Tag in Kultur zunehmenden Zellverlust musste ein möglicher Nährstoffverbrauch des Mediums oder ein Funktionsverlust der Stimulanzen IL-15 oder TGF- $\beta_1$  in Betracht gezogen werden. Nach Mediumwechsel mit erneuter Zugabe von IL-15 und TGF- $\beta_1$  am 10. Tag verloren die Zellen in den folgenden Messungen gleichermaßen zunehmend ihre Viabilität bis zum 20. Tag. Der in Anwesenheit von IL-15 und TGF- $\beta_1$  ab dem 10. Tag beobachtete Zellverlust ist am ehesten mit Apoptose der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten vereinbar. Ohne die Interleukine 2, 7 und 15 trat dieser bereits am 6. bis 7. Tag in Kultur ein.



**Abbildung 4.17: Proliferation humaner  $\gamma\delta$  T-Zellen in Kultur von Tag 0 bis Tag 20 in Anwesenheit von IL-15 und TGF- $\beta_1$ .** Die Zellen wurden über den angegebenen Zeitraum mit BrdU inkubiert, mit anti-BrdU-Antikörpern (FITC) und anti-CD103-Antikörpern (PE) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Kurven stellen die Mittelwerte von jeweils zwei unabhängigen Messreihen dar, bei der die CD103-positiven und die CD103-negativen Zellen aus ein und derselben Zellpopulation einander gegenübergestellt wurden.

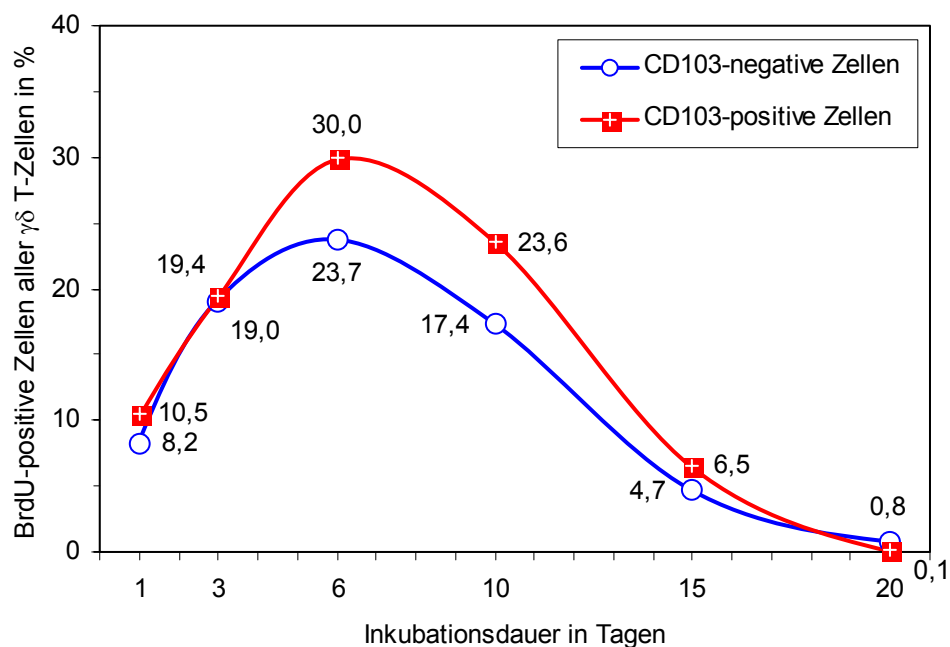
Aus der Abbildung lässt sich erkennen, dass die beiden Kurven nahezu parallel verlaufen. Der Anteil der CD103-positiven  $\gamma\delta$  T-Zellen an der Gesamtpopulation verhielt sich über die ersten 10 Tage wie in Kapitel 4.4 bereits dargestellt worden ist und fiel danach bis zum 20. Tag auf etwa 1/3 des Maximalwertes ab. Der Anteil an proliferierenden Zellen in dieser Untergruppe entsprach über den gesamten Zeitverlauf dem der CD103-negativen Zellen. Die Experimente zeigen, dass die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  das Proliferationsverhalten der Zellen nicht beeinflusst. Ferner konnte eine selektive Proliferation der Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierenden Zellen als Ursache für den in Anwesenheit von IL-15 und TGF- $\beta_1$  ansteigenden Anteil an CD103-positiven Zellen ausgeschlossen werden.

#### 4.5.2 Effekt von anti-CD103-Antikörper

Nun stellte sich die Frage, ob sich das Proliferationsverhalten der  $\gamma\delta$  T-Zellen über Bindung eines anti-CD103-Antikörpers an die  $\alpha^E$ -Untereinheit des exprimierten Integrins  $\alpha^E\beta_7$  beeinflussen lässt. *In vivo* würde dies einer Bindung der  $\gamma\delta$  T-Zellen über das auch als

„Homing-Rezeptor“ bezeichnete Integrin  $\alpha^E\beta_7$  an E-Cadherin entsprechen, welches sich auf der Zelloberfläche von Epithelzellen befindet. Eine durch diese Bindung ausgelöste Signaltransduktion könnte möglicherweise das Proliferationsverhalten der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten beeinflussen.

Die Zellen wurden in Kultur in Anwesenheit von IL-15, TGF- $\beta_1$  und anti-CD103-Ak inkubiert. An die  $\alpha^E$ -Untereinheit des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  band nach dessen Expression der dem Medium zugesetzte ungefärbte anti-CD103-Ak. Ein Anfärben der Zellen über PE-markierte anti-CD103-Ak zur durchflusszytometrischen Analyse war dadurch nicht mehr möglich. Um bei der Proliferationsmessung dennoch die Gruppen CD103-positiver Zellen und CD103-negativer Zellen einander gegenüberzustellen, wurden bei der BrdU-Färbung die Zellen zusätzlich mittels APC-markiertem goat-anti-mouse-Antikörper gefärbt. Dieser Antikörper band an den Fc-Teil des ungefärbten anti-CD103-Ak, der an der Zelloberfläche der CD103-positiven Zellen bereits gebunden war. Die Proliferation wurde wie in Abbildung 4.17 dargestellt untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass der anti-CD103-Ak mit seiner Bindung an das  $\alpha^E\beta_7$ -Antigen das Proliferationsverhalten CD103-positiver Zellen nicht beeinflusste.



**Abbildung 4.18:** Proliferation humaner  $\gamma\delta$  T-Zellen in Kultur von Tag 0 bis Tag 20 in Anwesenheit von IL-15, TGF- $\beta_1$  und anti-CD103-Ak. Die Zellen wurden über den angegebenen Zeitraum mit BrdU inkubiert, mit anti-BrdU-Antikörpern (FITC) und goat-anti-Mouse-Antikörpern (APC) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Kurven stellen die Mittelwerte von jeweils zwei unabhängigen Messreihen dar, bei der die CD103-positiven und die CD103-negativen Zellen aus ein und derselben Zellpopulation einander gegenübergestellt wurden.

## 4.6 Analyse der Proteinbiosynthese von $\gamma\delta$ T-Zellen

### 4.6.1 Vergleich zwischen humanen $\gamma\delta$ T-Zellen und der $\gamma\delta$ T-Zelllinie „Loucy“

Die für die Genchipanalyse verwendete Tumorzelllinie „Loucy“ war eine reine  $\gamma\delta$  T-Zelllinie, die aus dem peripheren Blut einer 38-jährigen Frau mit lymphoblastischer Leukämie gewonnen worden war. In Kultur teilten sich die Leukämiezellen fortwährend, ihre Zellzahl verdoppelte sich alle 60 Stunden. Bei dem  $\gamma\delta$  T-Zellklon handelte es sich wie bei dem überwiegende Teil (82%) der aus dem venösen Vollblut isolierten  $\gamma\delta$  T-Zellen um V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 T-Zellen. Die Loucy-Zellen besaßen einen CD3-Rezeptor und waren wie die meisten aus dem venösen Vollblut isolierten  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten CD4- und CD8-negativ. Durchflusszytometrische Messungen zeigten, dass die  $\gamma\delta$  T-Leukämiezellen unstimuliert in Kultur zu 0,5 % das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierten. Nach 24 Stunden Inkubation in Anwesenheit der Zytokine IL-15 und TGF- $\beta_1$  exprimierten 7 % der  $\gamma\delta$  T-Leukämiezellen das  $\alpha^E\beta_7$ -Antigen. Zusammenfassend kann man sagen, dass die  $\gamma\delta$  T-Zellen der Zelllinie „Loucy“ eine ähnliche Rezeptorausstattung wie die meisten aus dem venösen Vollblut isolierten  $\gamma\delta$  T-Zellen aufwiesen und ebenso wie diese in Gegenwart von IL-15 und TGF- $\beta_1$  das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierten.

### 4.6.2 Genchipanalyse der $\gamma\delta$ T-Leukämiezellen

Bisher wurde untersucht, wie die isolierten  $\gamma\delta$  T-Zellen *in vitro* stimuliert werden mussten, damit sie das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierten. Über die Funktion dieser Integrin-Expression ist jedoch nach wie vor nichts bekannt. Möglicherweise sind mit der Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  Zellstoffwechselveränderungen wie z. B. die Synthese von bestimmten Zytokinen oder zytotoxischen Substanzen verbunden. Mittels Genchips sollte versucht werden, Unterschiede in der Genexpression zwischen  $\gamma\delta$  T-Zellen, welche das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierten und denjenigen, welche dieses Integrin nicht exprimierten, zu identifizieren.

Für eine Genanalyse mit der Affymetrix-Genchip-Methode wurden je Genchip etwa  $1 \times 10^7$  Zellen benötigt. Damit wären, ein optimales Zellverhältnis von 50 % CD103-positiven und 50 % CD103-negativen Zellen nach entsprechender Stimulierung vorausgesetzt, etwa  $2 \times 10^7$  Zellen vor Zellsortierung nötig gewesen. Eine solche Anzahl von Zellen war methodisch bedingt nicht aus humanem Vollblut zu isolieren, da dies eine Isolation aus etwa 500 ml bis

1000 ml humanem Vollblut erfordert hätte. Aus diesem Grunde wurde zur Genanalyse auf die humane  $\gamma\delta$  T-Zelllinie „Loucy“ zurückgegriffen. Mit einer Verdoppelungsrate von 60 Stunden war die benötigte Zellzahl in kurzer Zeit zu erreichen.

Die  $\gamma\delta$  T-Zellen der Zelllinie „Loucy“ exprimierten zu 0,5 % das Integrin  $\alpha^E\beta_7$ . Durch Zugabe der Stimulanzen IL-15 und TGF- $\beta_1$  stieg der Anteil der Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierenden  $\gamma\delta$  T-Zellen innerhalb von 96 Stunden auf etwa 20 % an. Eine versuchsweise längere Inkubation zeigte keine nennenswerte Steigerung der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression. In diesem Punkt unterschieden sich die  $\gamma\delta$  T-Loucy-Zellen von den aus dem humanem Vollblut isolierten  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten, welche nach 5 Tagen Inkubation zu über 50 % das  $\alpha^E\beta_7$ -Antigen exprimierten. Diese Beobachtung könnte mit der Proliferation der Zellen erklärt werden und ließe den Schluss zu, dass neu gebildete  $\gamma\delta$  T-Loucy-Zellen das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  nicht exprimieren. Eine Beeinflussung bzw. Behinderung der Proteinbiosynthese durch die kontinuierliche Teilung und damit ständige Mitose-Phase der Tumorzellen ist ebenfalls denkbar.

Nach 96 Stunden Inkubation wurden aus den insgesamt  $3 \times 10^7$  Zellen die CD103-positiven und CD103-negativen Zellen durch Zellsortierung voneinander getrennt. Bei einem Anteil von 20 % an CD103-positiven Zellen konnten  $6 \times 10^6$  CD103-positive Zellen gewonnen werden. Von den CD103-negativen Zellen wurde die gleiche Zellzahl für die Genchipanalyse der Kultur entnommen, der Rest wurde verworfen. Mögliche funktionelle Unterschiede, die erst durch eine Aktivierung der CD103-positiven Zellen über das als Rezeptor fungierende Integrin  $\alpha^E\beta_7$  ausgelöst würden, sollten mit eingeschlossen werden. Deshalb wurden die nach der Sortierung mit anti-CD103-Ak besetzten  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten nach der Sortierung wieder in Kultur aufgenommen und für 5 Stunden inkubiert. Eine längere Inkubationszeit als 5 Stunden schien nicht sinnvoll, da die vitalen Zellen sich in Kultur exponentiell weitervermehrten und die geteilten Zellen ohne erneute Aktivierung durch IL-15 und TGF- $\beta_1$  sich möglicherweise funktionell von aktivierten CD103-positiven Zellen unterscheiden. Bei einer Verdoppelungszeit von 60 Stunden würden sich in 5 Stunden nur etwa 6 % der Zellen geteilt haben ( $2^{5/60} \approx 1,06$ ). Für eine Signaltransduktion über den CD103-Rezeptor mit entsprechender Beeinflussung des Gentranskriptionsmusters und der mRNA-Synthese dürfte diese Zeit jedoch ausgereicht haben.

Die analysierten mRNA-Mengen beider Genchips waren aufgrund der gleichen Zellzahlen von jeweils  $6 \times 10^6$  Zellen direkt miteinander vergleichbar. Je Genchip wurden die 12626 gemessenen Gene an Hand der gemessenen mRNA-Werte in vorhanden ( $>200$ ), grenzwertig vorhanden (100 bis 200) und nicht vorhanden ( $< 100$ ) eingeteilt. In jeder der beiden Zellkulturen waren jeweils etwa 40 % der analysierten Gene vorhanden und etwa 1,7 % grenzwertig vorhanden. Die meisten Gene wurden in beiden Zellkulturen gleichermaßen transkribiert und wiesen nahezu identische mRNA-Werte auf. Die jeweiligen mRNA-Werte wurden in Relation zueinander gesetzt, wobei der größere mRNA-Wert durch den kleineren dividiert wurde. Diesem Quotienten wurde ein negatives Vorzeichen vorangestellt, falls die Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierende Zellkultur für das untersuchte Gen einen geringeren mRNA-Wert aufwies, d. h. die Genaktivität mit Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  abnahm. Ein deutlich von 1,0 bzw.  $-1,0$  differenter Verhältnisfaktor deutete auf eine entsprechend unterschiedliche Genaktivität in den beiden Zellkulturen hin und ließ auf funktionelle Unterschiede schließen.

CD103-negative $\gamma\delta$ T-Zellen	CD103-positive $\gamma\delta$ T-Zellen	Verhältnis- faktor	Gen	Code / Definition
-623,2	-80,1	1,0	IL-2	M22005, HUMIL2AB, clone pATacIL-2C/2TT, mRNA, complete cds
-91,8	26,6	1,0	IL-7	J04156, HUMIL7A, mRNA, complete cds
-145,8	17,3	1,0	IL-15	U14407, HSU14407, mRNA, complete cds
215,9	20,5	-2,2	IFN- $\gamma$	J00219, HUMIFNG, mRNA, complete cds
97,8	105,3	1,1	TNF- $\alpha$	X02910, HSTNFA, mRNA, expanded cds
-205,8	-91,7	1,0	E-Cadherin	Z35402, HSECAD3, mRNA, exon 3 and joined cds

**Tabelle 4.6:** *Genexpression einiger ausgewählter Gene der Genchipanalyse der  $\gamma\delta$  T-Zelllinie „Loucy“. Dargestellt sind Gene, die bei den CD103-negativen und bei den CD103-positiven Zellen nicht oder nur minimal exprimiert wurden. Die angegebenen mRNA-Werte spiegeln die durchschnittliche Transkriptionsleistung der Zellen für die einzelnen Gene wieder. Eine Expression wurde bei einem mRNA-Wert  $> 100$  angenommen. Bei kleineren und negativen Werten wurde zur Berechnung des Verhältnisfaktors der mRNA-Wert auf 100 definiert. Bei einem mRNA-Wert zwischen 100 und 200 ist das Gen als minimal bzw. nicht sicher exprimiert einzustufen.*



Wie in Tabelle 4.6 dargestellt exprimieren die  $\gamma\delta$  T-Zellen die Interleukine 2, 7 und 15, über die sie stimuliert werden konnten, unter den hier gewählten Bedingungen nicht selbst. Folglich kann eine Autostimulation der  $\gamma\delta$  T-Zellen über diese Interleukine als unwahrscheinlich eingestuft werden.

Das Lymphokin IFN- $\gamma$  wurde von den Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierenden Zellen nicht synthetisiert. Bei den  $\gamma\delta$  T-Zellen, welche das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  nicht exprimierten, könnte bei einem mRNA-Wert von 215,9 eine schwache IFN- $\gamma$ -Synthese vorliegen. Das von Makrophagen und T-Lymphozyten sezernierte Zytokin TNF- $\alpha$  wurde von keiner der beiden Zellkulturen gebildet. Das Adhäsionsmolekül E-Cadherin, welches charakteristischerweise auf der Zelloberfläche von Epithelzellen zu finden ist und als Bindungspartner für das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  fungiert, wurde von den  $\gamma\delta$  T-Zellen ebenfalls nicht synthetisiert.

CD103-negative $\gamma\delta$ T-Zellen	CD103-positive $\gamma\delta$ T-Zellen	Verhältnis- faktor	Gen	Code / Definition
290,6	49,5	-2,9	IL-2-Rezeptor	X01057, HSIL2REC, mRNA
450,4	504,6	1,1	IL-4-Rezeptor	X52425, HSIL4R, mRNA
774,3	953,2	1,2	IL-7-Rezeptor	M29696, HUMIL7AA, mRNA, complete cds
877,4	266,9	-3,3	IL-9-Rezeptor, Vorläufergen	L39064, HUMIL9RA, mRNA, complete cds
284,5	139,3	-2,0	IL-15-Rezeptor, Vorläufergen	HSU31628, mRNA, complete cds
300,4	421,6	1,4	TGF- $\beta_1$ -Rezeptor	AF054598, HSTGFBR1G9, mRNA, exon 9 and complete cds
3735,7	3354,6	-1,1	TGF- $\beta$ -Rezeptor-inter- agierendes-Protein-1	U36764, HSU36764, mRNA, complete cds

**Tabelle 4.7:** *Genexpression der Rezeptoren für die Zytokine IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 und IL-15 und TGF- $\beta_1$  der Genchipanalyse der  $\gamma\delta$  T-Zelllinie „Loucy“. Die angegebenen mRNA-Werte spiegeln die durchschnittliche Transkriptionsleistung der Zellen für die einzelnen Gene wieder. Der Verhältnisfaktor gibt das Verhältnis der mRNA-Werte zueinander an, wobei bei mRNA-Werten < 100 zur Berechnung des Verhältnisfaktors der mRNA-Wert auf 100 definiert wurde. Das Vorzeichen des Verhältnisfaktors zeigt an, ob die mRNA-Synthese mit Expression des  $\alpha^E\beta_7$ -Antigens zu- oder abgenommen hat.*

Neben den Rezeptoren für die Zytokine IL-2, IL-7, IL-15 und TGF- $\beta_1$ , deren Synthese aufgrund der Stimulations-Versuche dieser Arbeit zu vermuten war, synthetisierten die  $\gamma\delta$  T-Zellen auch Rezeptoren für die Interleukine IL-4 und IL-9. Die Interleukin-Rezeptoren für IL-2, IL-9 und IL-15 wurden bei den CD103-positiven Zellen in geringerem Maße synthetisiert. Beim IL-2-Rezeptor könnte man sogar von einem Verlust der Rezeptor-Synthese bei CD103-Expression sprechen.

CD103-negative $\gamma\delta$ T-Zellen	CD103-positive $\gamma\delta$ T-Zellen	Verhältnis- faktor	Gen	Code / Definition
3693,8	3651,6	-1,0	TGF- $\beta_1$	M38449, HUMTGFBFA, clone pTGF-beta-trp114, mRNA, complete cds
881,5	951,6	1,1	P-Selectin-Glykoprotein-Ligand (SELPLG)	U25956, Cluster /cds=(5,1243) /gb=U25956 /gi=902796 /ug=Hs.79283 /len=2017
2275,6	2193,5	-1,0	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF)	AF022375, Cluster /cds=(701,1276) /gb=AF022375 /gi=3719220 /ug=Hs.73793 /len=3154, mRNA, complete cds
1194,1	1333,4	1,1	Angiopoietin-1 (Ang-1)	U83508, HSU83508, mRNA, complete cds
5978,6	6255,8	1,0	Makrophagen-spezifischer Kolonie-stimulierender Faktor (CSF-1)	M37435, HUMCSDF1, mRNA, complete cds
30324,8	29615,1	-1,0	Makrophagen-Migration inhibierender Faktor (MIF)	L19686, HUMMIF, mRNA, complete cds
7660,1	7680,2	1,0	TIMP ('tissue inhibitor of metalloproteinases')	D11139, HUMTIMP, exons#1-4, partial sequence

**Tabelle 4.8:** *Genexpression einiger ausgewählter Gene der Genchipanalyse der  $\gamma\delta$  T-Zelllinie „Loucy“. Dargestellt sind Gene, die bei den CD103-negativen und bei den CD103-positiven Zellen in gleichem Maße exprimiert wurden. Die angegebenen mRNA-Werte spiegeln die durchschnittliche Transkriptionsleistung der Zellen für die einzelnen Gene wieder.*

Interessanterweise synthetisierten die  $\gamma\delta$  T-Zellen unabhängig von ihrer  $\alpha^E\beta_7$ -Expression das auf sie selbst stimulierend wirkende Zytokin TGF- $\beta_1$ . Die Synthese des P-Selectin-Glykoprotein-Liganden (SELPLG) lässt vermuten, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen unabhängig von ihrer Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression an Endothelzellen binden können, wenn diese das P-Selectin auf ihrer Oberfläche exprimieren. Ferner wurden von beiden Zellkulturen gleichermaßen der

vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF, das Angiopoietin-1, der Makrophagen-spezifische Kolonie-stimulierende Faktor (CSF-1), der Makrophagen-Migration inhibierende Faktor (MIF) und der Gewebsinhibitor für Metalloproteinasen (TIMP) synthetisiert.

CD103-negative $\gamma\delta$ T-Zellen	CD103-positive $\gamma\delta$ T-Zellen	Verhältnis- faktor	Gen	Code / Definition
1048,8	134,0	-7,8	hochaffiner IgE-Rezeptor (FcERI), $\alpha$ -Untereinheit	X06948, Cluster /cds=(106,879) /gb=X06948 /gi=31317 /ug=Hs.897 /len=1171, mRNA
1123,7	-115,0	-11,2	Serotonin-Rezeptor 5-HT <sub>4</sub>	Y08756, Cluster /cds=(18,1181) /gb=Y08756 /gi=2661732 /ug=Hs.113262 /len=1336, mRNA
969,6	-50,5	-9,7	Substanz-P- Rezeptor-Protein	M74290, Cluster /cds=(210,1433) /gb=M74290 /gi=338612 /ug=Hs.1080 /len=1766, mRNA
1222,4	211,3	-5,8	EDN ('eosinophil derived neurotoxin')	X55988, EDN, Cluster /cds=(71,556) /gb=X55988 /gi=31088 /ug=Hs.728 /len=735, mRNA
951,8	274,7	-3,5	Elastin	M36860, Cluster /cds=(49,2241) /gb=M36860 /gi=182061 /ug=Hs.203917 /len=2242, mRNA, complete cds

**Tabelle 4.8:** *Genexpression einiger ausgewählter Gene der Genchipanalyse der  $\gamma\delta$  T-Zelllinie „Loucy“. Dargestellt sind Gene, die bei den CD103-positiven deutlich weniger als bei den CD103-negativen Zellen exprimiert wurden. Die angegebenen mRNA-Werte spiegeln die durchschnittliche Transkriptionsleistung der Zellen für die einzelnen Gene wieder. Der negative Verhältnisfaktor gibt das Verhältnis der mRNA-Werte zueinander an, wobei bei mRNA-Werten < 100 zur Berechnung des Verhältnisfaktors der mRNA-Wert auf 100 definiert wurde.*

Einige Gene wurden bei den CD103-positiven Zellen im Vergleich zu den CD103-negativen Zellen nicht mehr oder zumindest in geringerem Maße transkribiert. CD103-negative  $\gamma\delta$  T-Zellen sind offensichtlich in der Lage, über hochaffine IgE-Fc-Rezeptoren IgE-Antikörper an ihrer Oberfläche zu binden. Mit Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  würden nach den Daten der Genchipanalyse aktivierte  $\gamma\delta$  T-Zellen diese Eigenschaft verlieren. Des Weiteren werden von CD103-negativen  $\gamma\delta$  T-Zellen der Serotonin-Rezeptor 5-HT<sub>4</sub>, der Rezeptor für Substanz P und das von den eosinophilen Granulozyten abgeleitete Neurotoxin EDN synthetisiert. Eine Elastin-Produktion durch  $\alpha^E\beta_7$ -negative Zellen ist zu vermuten.

CD103-negative $\gamma\delta$ T-Zellen	CD103-positive $\gamma\delta$ T-Zellen	Verhältnis- faktor	Gen	Code / Definition
181,6	730,2	4,0	Integrin- $\beta_7$ - Untereinheit	M68892, HUMINTB7, mRNA, complete cds
-191,3	935,4	9,3	Integrin- $\alpha_5$ - Untereinheit	X06256, Cluster /cds=(23,3172) /gb=X06256 /gi=31437 /ug=Hs.149609 /len=4204, mRNA
450,6	1017,5	2,3	endotheliale Mono- zyten aktivierendes Polypeptid II (EMAP II)	U10117, Cluster /cds=(49,987) /gb=U10117 /gi=498909 /ug=Hs.146401 /len=1057, mRNA, complete cds
385,0	1467,3	3,8	Pankreatische Elastase IIA	M16652, Cluster /cds=(26,835) /gb=M16652 /gi=182057 /ug=Hs.21 /len=914, mRNA, complete cds
28,4	257,1	2,6	Pankreatische Elastase IIB	M16653, Cluster /cds=(25,834) /gb=M16653 /gi=182059 /ug=Hs.169234 /len=922, mRNA, complete cds

**Tabelle 4.9:** *Genexpression einiger ausgewählter Gene der Genchipanalyse der  $\gamma\delta$  T-Zelllinie „Loucy“. Dargestellt sind Gene, die bei den CD103-positiven deutlich stärker als bei den CD103-negativen Zellen exprimiert wurden. Die angegebenen mRNA-Werte spiegeln die durchschnittliche Transkriptionsleistung der Zellen für die einzelnen Gene wieder. Der Verhältnissfaktor gibt das Verhältnis der mRNA-Werte zueinander an, wobei bei mRNA-Werten < 100 zur Berechnung des Verhältnissfaktors der mRNA-Wert auf 100 definiert wurde.*

Da sich das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  aus einer  $\alpha^E$ - und einer  $\beta_7$ -Untereinheit zusammensetzt, war die sehr viel höhere Expression der  $\beta_7$ -Untereinheit bei den CD103-positiven Zellen zu erwarten. Die Synthese der  $\alpha^E$ -Untereinheit wurde nicht analysiert, da eine solche Analyse auf den verwendeten Genchips nicht vorgesehen war. Die minimale Synthese der  $\beta_7$ -Untereinheit bei den CD103-negativen Zellen könnte auf den Anteil der  $\gamma\delta$  T-Zellen zurückgeführt werden, die über TGF- $\beta_1$  und IL-15 bereits zur Synthese der mRNA für das Integrin stimuliert worden waren, dieses jedoch noch nicht ribosomal zum Oberflächenrezeptor  $\alpha^E\beta_7$  umgesetzt hatten.

Die  $\alpha^E\beta_7$ -exprimierenden  $\gamma\delta$  T-Zellen synthetisierten neben der Integrin- $\beta_7$ -Untereinheit in vergleichbarem Maße auch die Integrin- $\alpha_5$ -Untereinheit. Diese  $\alpha_5$ -Untereinheit könnte auf  $\alpha^E\beta_7$ -positiven  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten beispielsweise zusammen mit der Integrin- $\beta_1$ -Untereinheit das Integrin  $\alpha_5\beta_1$  (CD49e/CD29) bilden. Das Integrin  $\alpha_5\beta_1$  ist ein auf verschiedenen Zellen weitverbreitetes Integrin.

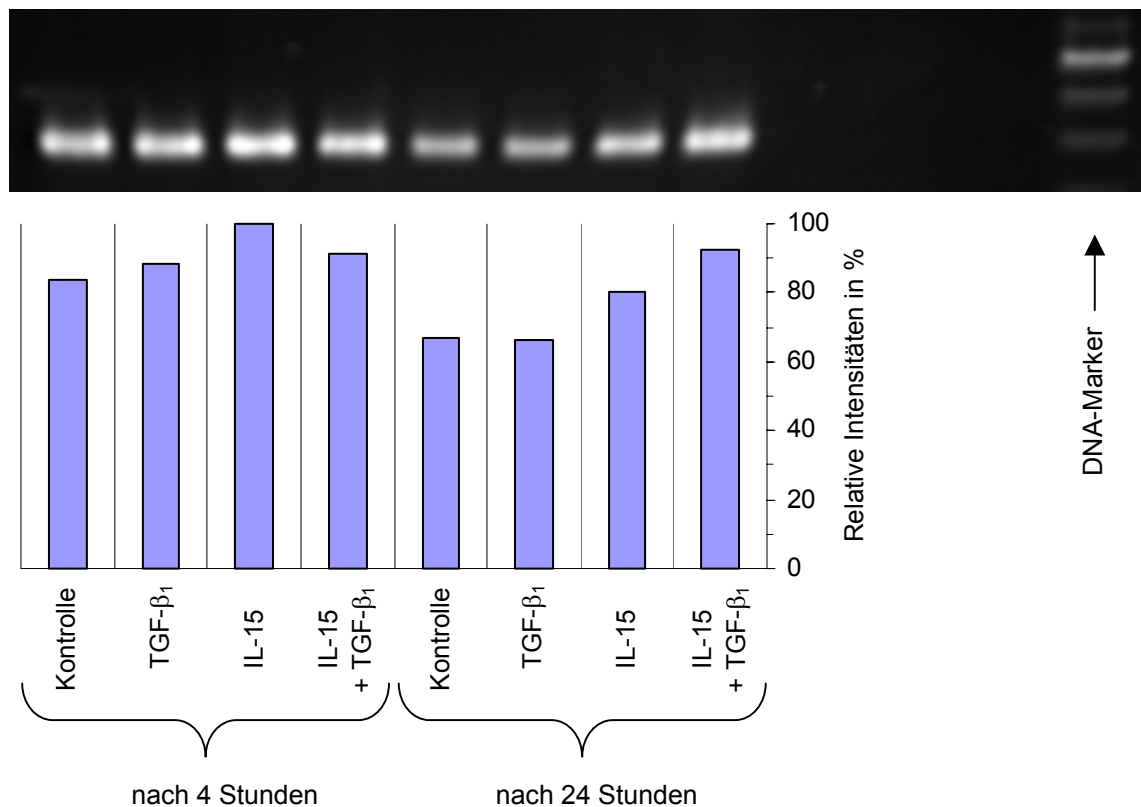
Im Gegensatz zu den CD103-negativen Zellen zeigten die CD103-positiven  $\gamma\delta$  T-Zellen eine deutliche Synthese der Pankreatischen Elastase IIA und in geringerem Maße auch der Pankreatischen Elastase IIB. Mit einer Zunahme des mRNA-Wertes von 385,0 auf 1467,3, was einer Steigerung der mRNA-Synthese um den Faktor 3,8 entsprach, handelte es sich bei der Pankreatischen Elastase IIA um eine der auffälligsten funktionellen Veränderungen der  $\gamma\delta$  T-Zellen, die mit der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression verbunden waren und die mit der Genchipanalyse gezeigt werden konnten. Das sich gleichsinnig verhaltende Schwesterenzym Pankreatische Elastase IIB deutet ebenfalls darauf hin, dass  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten in der Lage sind, Pankreatische Elastase zu bilden und lässt einen in Betracht zu ziehenden zufälligen Messfehler als sehr unwahrscheinlich erscheinen.

#### **4.7 Kontrolle und Validierung ausgewählter Messergebnisse mit der Polymerasekettenreaktion**

##### **4.7.1 Nachweis der Synthese des Integrins $\alpha^E\beta_7$ mittels PCR**

Die Synthese des bisher durchflusszytometrisch nachgewiesenen Integrins  $\alpha^E\beta_7$  sollte mit der Polymerasekettenreaktion bestätigt werden. Die PCR gilt mit ihrer hohen Sensitivität und Spezifität als Goldstandard zum indirekten Nachweis von Proteinen, die in Zellen synthetisiert werden.

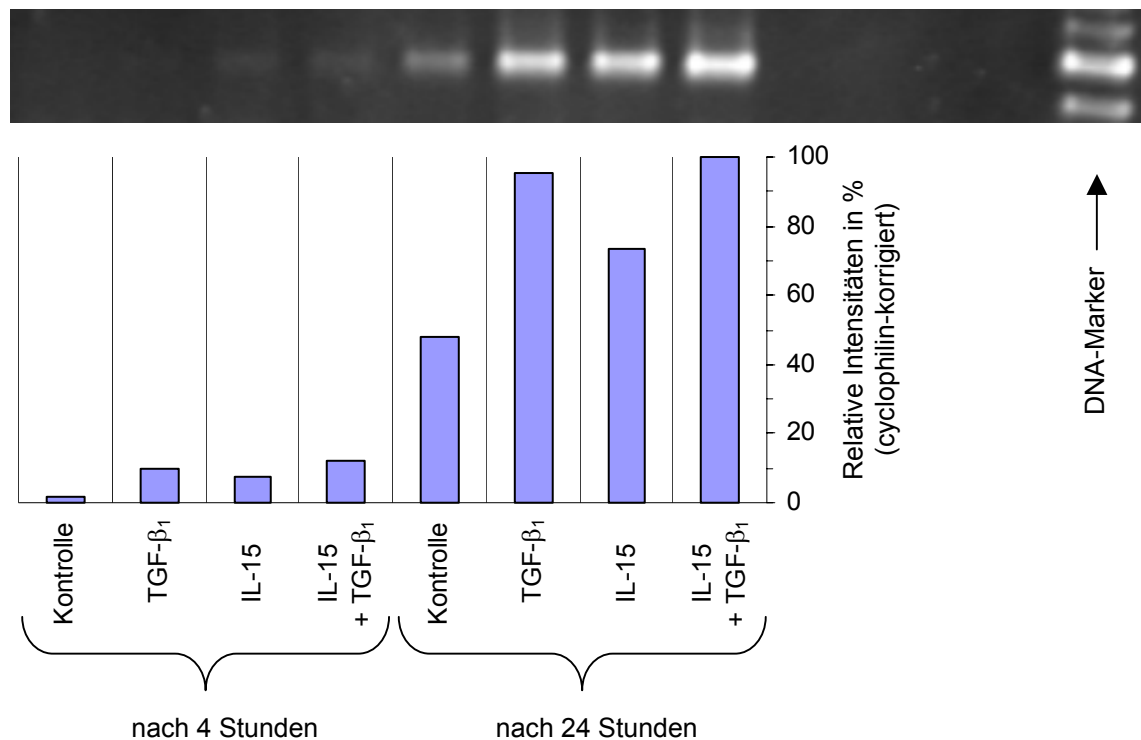
Die  $\gamma\delta$  T-Zellen zeigten nach der Isolierung aus dem venösen Vollblut nur zu etwa 2 % eine Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  auf ihrer Zelloberfläche. Dieses wurde nach Stimulierung mit TGF- $\beta_1$ , IL-15 oder der Kombination dieser beiden Zytokine exprimiert, was eine entsprechende mRNA-Synthese mit anschließender ribosomaler Proteinsynthese voraussetzt. Somit musste die mRNA, welche für die Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Synthese als Matrize dient, mittels PCR prinzipiell möglich sein. Nicht bekannt war, nach welcher Inkubations- bzw. Stimulationszeit die mRNA des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  transkribiert im Zytoplasma vorliegt. Die Gesamt-mRNA wurde nach 4 und nach 24 Stunden aus den Zellkulturen isoliert, die ohne sowie in Anwesenheit von TGF- $\beta_1$ , IL-15 und der Kombination dieser beiden Zytokine inkubiert worden waren. Nach Umschreiben der mRNA in cDNA wurde nach 30 Zyklen PCR die Expression des Haushaltgens Cyclophilin und nach 35 Zyklen PCR die Expression des Gens für das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  bestimmt.



**Abbildung 4.19:** Messung der amplifizierten cDNA des von humanen  $\gamma\delta$  T-Zellen transkribierten Haushaltsgens Cyclophilin nach 4 und 24 Stunden Inkubation in Anwesenheit von IL-15 und TGF- $\beta_1$ . Nach 30 Zyklen PCR wurden die cDNA-Banden im Elektrophorese-Gel photometrisch analysiert. Der DNA-Marker wurde in die Geltasche am rechten Bildrand aufgetragen. Die Laufweite der Cyclophilin-DNA (326 Basenpaare) stimmt mit der Laufweite der entsprechenden Bande des DNA-Markers überein. Das Säulendiagramm zeigt die gemessenen Intensitäten in % (bezogen auf den Maximalwert) eines Experimentes.

Die Intensitäten der gemessenen Cyclophilin-Banden spiegeln die Zellzahl der einzelnen Ansätze wieder, aus denen die mRNA, isoliert wurde. Das Haushaltsgen Cyclophilin wird von Zellen konstant und zytokinunabhängig synthetisiert. Die 8 Proben aus den unterschiedlichen Kulturen wiesen in der Intensität ähnliche Cyclophilin-Banden auf. Die etwas geringeren cDNA-Mengen bei den über 24 Stunden inkubierten Ansätzen ohne IL-15 könnten auf eine geringere Zellproliferation und auf einen möglichen Zellverlust durch Apoptose zurückzuführen sein. Die Ergebnisse der Genchipanalyse zeigten, dass das Haushaltsgen Cyclophilin zu den am stärksten transkribierten Genen gehörte. Es wies verglichen mit dem Gen für das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  bzw. dessen Untereinheit  $\beta_7$  in der Genchipanalyse die etwa 30-fache mRNA-Menge auf. Daher wurden zur Messung des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  bei der PCR 35 Zyklen statt der bei Cyclophilin üblichen 30 Zyklen gewählt ( $2^{(35-30)} = 32$ ). Die unterschiedliche Anzahl von Zyklen beeinflusst oder verzerrt das

Verhältnis der gemessenen cDNA-Mengen zueinander in den verschiedenen Ansätzen nicht. Daher ist die Wahl von unterschiedlichen Zykluszahlen, um eine optimale Darstellung für die photometrischen Analyse zu erreichen, zu vertreten.



**Abbildung 4.20:** Messung der amplifizierten cDNA des von den  $\gamma\delta$  T-Zellen transkribierten Gens für das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  nach 4 und 24 Stunden Inkubation in Anwesenheit von IL-15 und TGF- $\beta_1$ . Nach 35 Zyklen PCR wurden die cDNA-Banden im Elektrophorese-Gel photometrisch analysiert. Der DNA-Marker wurde in die Geltasche am rechten Bildrand aufgetragen. Die Laufweite der Integrin-DNA (447 Basenpaare) stimmt mit der Laufweite der entsprechenden Bande des DNA-Markers überein. Das Säulendiagramm zeigt die cyclophilin-korrigierten Intensitäten in % (bezogen auf den Maximalwert) eines repräsentativen Experimentes.

Das Gen für das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  konnte bei den Zellen, die 24 Stunden in Anwesenheit der Zytokine TGF- $\beta_1$  und IL-15 inkubiert worden waren, deutlich nachgewiesen werden. Ohne Zytokinzugabe zeigte sich eine geringere Synthese des Integrins. Die TGF- $\beta_1$ -Proben wiesen gegenüber der IL-15-Probe zu beiden Zeitpunkten eine etwas höhere Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Synthese auf. In den Proben mit nur 4 Stunden Inkubation waren die cDNA-Mengen jedoch kaum nachweisbar. Weiterführende Messungen unserer Arbeitsgruppe mit Inkubationszeiten von 4, 8, 24 und 48 Stunden in Anwesenheit von TGF- $\beta_1$  kombiniert mit IL-15 zeigten, dass das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden maximal synthetisiert wurde (Workalemahu et al., 2001).

In der folgenden Tabelle sind die mit Hilfe der gemessenen Cyclophilin-Intensitäten korrigierten Messwerte dargestellt.

	Kontrolle	TGF- $\beta_1$	IL-15	IL-15 + TGF- $\beta_1$
nach 4 Stunden	1,6 %	10,1 %	7,7 %	11,9 %
nach 24 Stunden	48,1 %	95,3 %	73,5 %	100,0 %

**Tabelle 4.10:** *Photometrisch bestimmte cDNA-Werte, welche die durchschnittliche Transkriptionsleistung der  $\gamma\delta$  T-Zellen für das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  widerspiegeln. Die Daten wurden mit Hilfe der Cyclophilin-Messwerte korrigiert, so dass sie vergleichbare, nicht durch unterschiedliche Zellzahlen verzerrte Werte darstellen. Der Maximalwert wurde auf 100 % definiert.*

Die  $\gamma\delta$  T-Zellen wiesen in Anwesenheit der Zytokine nach 4 Stunden Inkubation eine geringe, photometrisch jedoch nachweisbare Synthese des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  auf. Nach 24 Stunden Inkubation war die Syntheseleistung für dieses Gen bei den entsprechenden Stichproben auf das 9- bis 10-fache angestiegen. An Hand der Werte könnte vermutet werden, dass die Anwesenheit von TGF- $\beta_1$  verglichen mit IL-15 zu einer etwas schnelleren und ggf. auch stärkeren Synthese des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  führte. Auch in den Kontrollen ohne Zusatz von Stimulanzien ließ sich nach 24 Stunden das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  nachweisen, obwohl durchflusszytometrisch keine erhöhte Expression des Integrins festgestellt werden konnte.

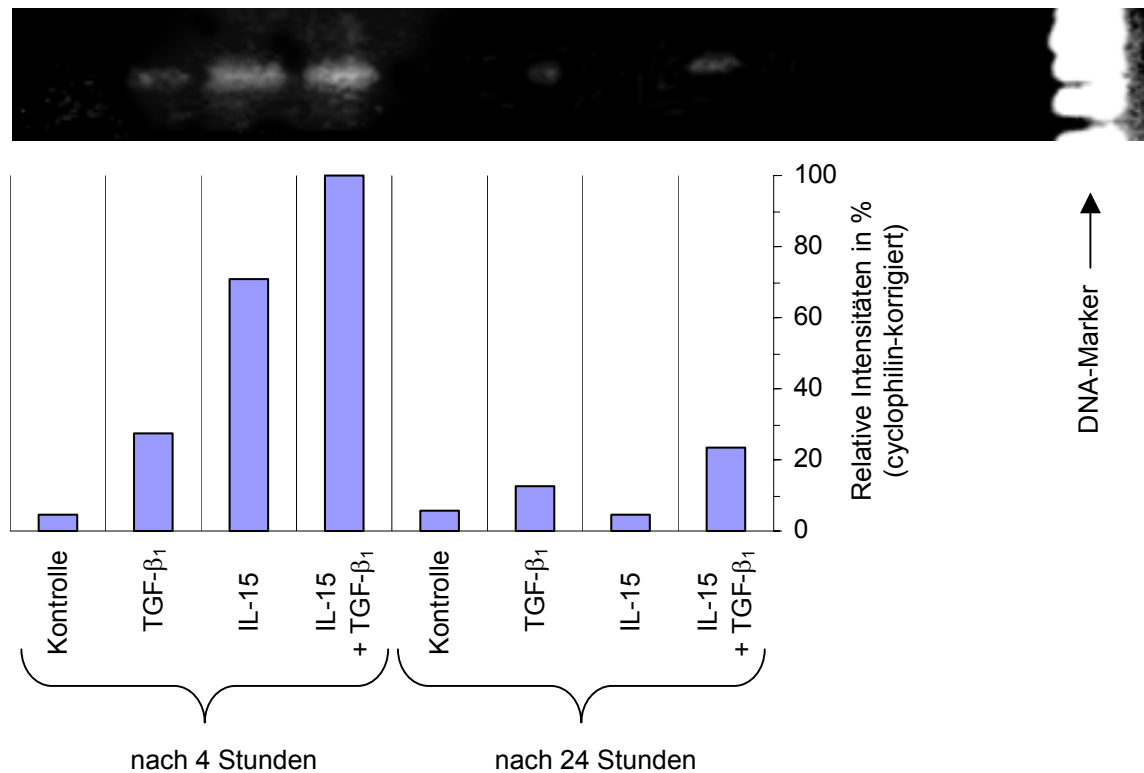
#### 4.7.2 Synthese der Pankreatischen Elastase IIA in humanen $\gamma\delta$ T-Zellen

Die Synthese der Pankreatischen Elastase IIA wurde mittels Genchipanalyse bei den  $\gamma\delta$  T-Zellen der Tumorzelllinie „Loucy“ nachgewiesen. Ziel war es, eine solche Enzymproduktion bei humanen, aus dem venösen Vollblut isolierten  $\gamma\delta$  T-Zellen mittels PCR zu bestätigen. Hieraus ließen sich Rückschlüsse bzgl. der funktionellen Bedeutung von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten im entzündlichen Mikromilieu ableiten.

Da bei der Genchipanalyse die Pankreatische Elastase IIA nur von  $\gamma\delta$  T-Zellen, welche das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierten, synthetisiert wurde, wäre zu erwarten, dass nur bei den mit IL-15 oder TGF- $\beta_1$  stimulierten  $\gamma\delta$  T-Zellen eine mRNA-Expression des Elastase-Gens mittels PCR nachweisbar sein würde. Die  $\gamma\delta$  T-Zellen wurden wie unter 4.7.1 stimuliert und ebenfalls nach



4 Stunden und nach 24 Stunden Inkubation analysiert. Die gemessenen cDNA-Werte konnten mit Hilfe der in Abbildung 4.19 dargestellten Cyclophilin-Intensitäten korrigiert werden, da bei beiden PCR-Analysen die  $\gamma\delta$  T-Zellen aus denselben Ansätzen stammten.



**Abbildung 4.21:** Messung der amplifizierten cDNA des von den  $\gamma\delta$  T-Zellen transkribierten Gens für das Enzym Pankreatische Elastase IIA nach 4 und 24 Stunden Inkubation in Anwesenheit von IL-15 und TGF- $\beta_1$ . Nach 35 Zyklen PCR wurden die cDNA-Banden im Elektrophorese-Gel photometrisch analysiert. Der DNA-Marker wurde in die Geltasche am rechten Bildrand aufgetragen. Die Laufweite der cDNA der Pankreatischen Elastase IIA (407 Basenpaare) stimmt mit der Laufweite der entsprechenden Bande des DNA-Markers überein. Das Säulendiagramm zeigt die cyclophilin-korrigierten Intensitäten in % (bezogen auf den Maximalwert) eines repräsentativen Experimentes.

Wie in Abbildung 4.21 dargestellt kommt es bei einer Stimulation der  $\gamma\delta$  T-Zellen mit IL-15 und TGF- $\beta_1$  innerhalb von 4 Stunden zu einer mRNA-Expression für die Pankreatische Elastase IIA. Nach 24 Stunden Inkubation fand sich eine deutlich niedrigere Synthese der Pankreatischen Elastase IIA. Ohne die Zytokinzusätze von TGF- $\beta_1$  oder IL-15 konnte weder nach 4 noch nach 24 Stunden Inkubation eine Synthese der Elastase nachgewiesen werden.

Wie auch die  $\gamma\delta$  T-Zellen der Tumorzelllinie „Loucy“ besitzen auch humane aus dem venösen Vollblut isolierte  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten die Fähigkeit, die Pankreatische Elastase IIA zu

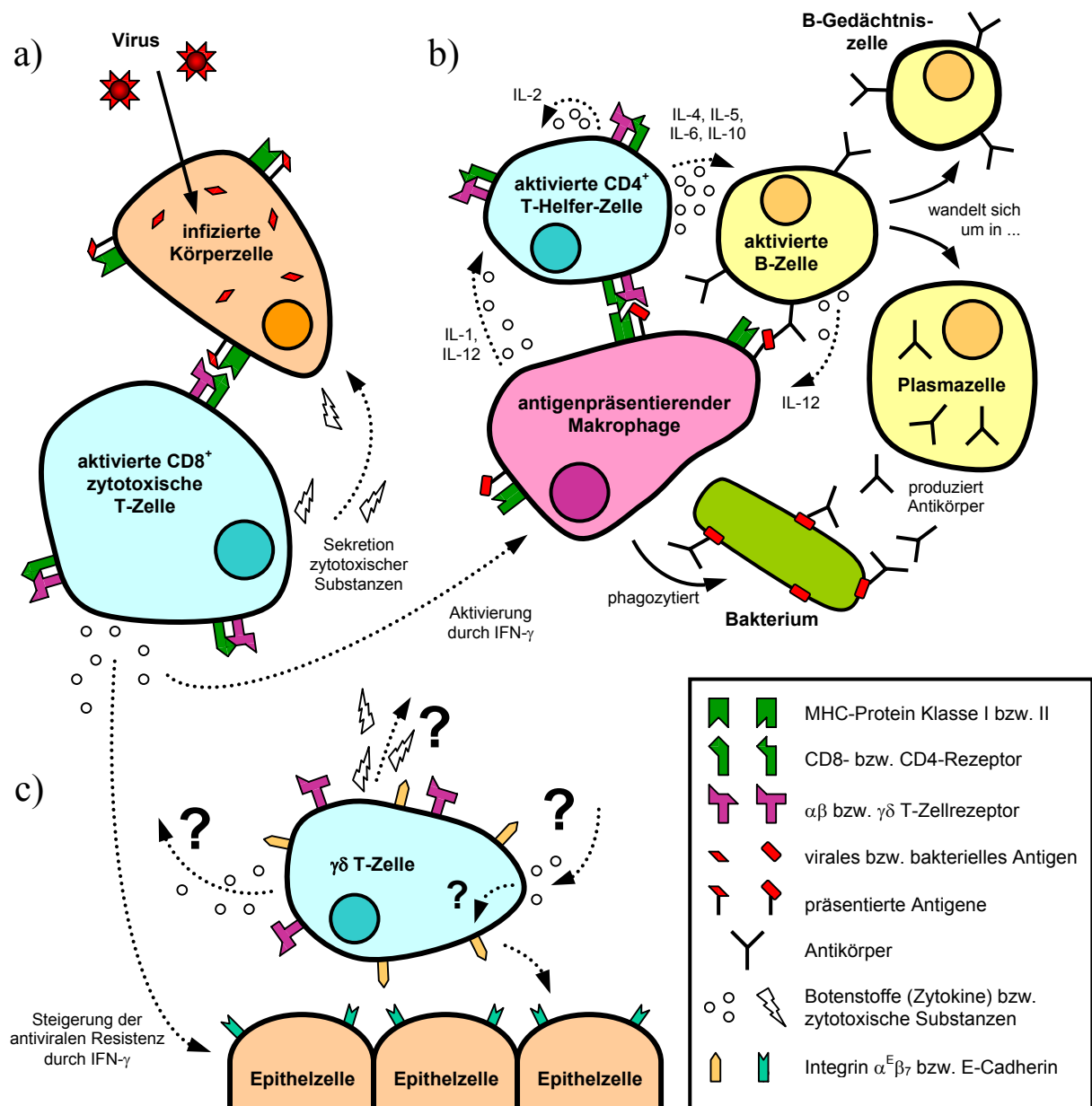
synthetisieren. Aufgrund der Ergebnisse der Genchipanalyse ist davon auszugehen dass die Synthese der Pankreatischen Elastase IIA eng mit der Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  verknüpft ist. Demnach produzieren in Anwesenheit der Zytokine IL-15 und TGF- $\beta_1$  nur die  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten des  $\alpha^E\beta_7$ -Phänotyps die Pankreatische Elastase IIA.

## 5 Diskussion

### 5.1 *Der $\gamma\delta$ T-Lymphozyt als Bestandteil des Immunsystems*

Das Immunsystem erreicht seine hohe Effektivität erst durch das Zusammenspiel von spezifischen, unspezifischen, zellulären und humoralen Mechanismen. Dabei spielen sowohl immunmodulatorische als auch zytotoxische Funktionen eine wichtige Rolle. Es existieren Modelle für die verschiedenen Bereiche des Immunsystems. Makrophagen phagozytieren Antigene und präsentieren diese nach entsprechender Prozessierung auf ihrer Zelloberfläche. Diese werden von  $CD4^+$  T-Lymphozyten, den T-Helfer-Zellen, erkannt, woraufhin diese mittels entsprechender Ausschüttung von Interleukinen B-Zellen aktivieren, welche sich zu immunglobulin-produzierenden Plasmazellen umwandeln. Demnach besitzen  $CD4^+$  T-Lymphozyten aktivierende immunmodulatorische Eigenschaften. Um einer ungebremsten Aktivierung entgegenzuwirken, besitzt das Immunsystem auch Zellen mit hemmendem Charakter, sogenannte T-Suppressor-Zellen, wobei es sich hierbei überwiegend um  $CD8^+$  T-Lymphozyten handelt. Auf der einen Seite können Bakterien über Aktivierung des Komplement-Systems, teilweise mit Hilfe von Antikörpern, ohne Anwesenheit von Zellen abgetötet werden. Auf der anderen Seite existieren aber auch spezielle zytotoxische Zellen im Immunsystem, um z. B. mit Viren infizierte körpereigene Zellen anzutöten. Nach den heutigen Modellen handelt es sich bei diesen Zellen hauptsächlich um  $CD8^+$  zytotoxische T-Lymphozyten.

Ein befriedigendes Modell für die Rolle der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten im Immunsystem konnte bis heute jedoch nicht präsentiert werden. Die Aufgaben der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten, welche neben den  $CD4^+$  und  $CD8^+$   $\alpha\beta$  T-Lymphozyten eine eigenständige Gruppe von T-Lymphozyten bilden, scheinen vielfältig zu sein. Es werden sowohl immunmodulatorische als auch antimikrobielle und zytotoxische Eigenschaften vermutet. Die folgende Abbildung veranschaulicht, wie wenig über das Zusammenspiel des  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten mit den ihn umgebenden Entzündungs- und Epithelzellen bisher bekannt ist.



**Abbildung 5.1: Zusammenspiel verschiedener Entzündungszellen bei der zellulären Immunität.** Vereinfachte Darstellung ohne Differenzierung zwischen T-Helfer-Lymphozyten Typ 1 und 2.

a) Erkennen einer virusinfizierten Körperzelle durch einen CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Lymphozyten. Lyse der Zelle durch Sekretion von zytotoxischen Substanzen. b) Präsentation von phagozytierten bakteriellen Antigenen nach entsprechendem Processing auf der Zelloberfläche eines Makrophagen. Erkennen dieser Antigene durch einen B-Lymphozyten, welcher sich mit Hilfe eines aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Lymphozyten in eine Plasmazelle umwandelt, die daraufhin für das erkannte Antigen spezifische Antikörper produziert. c) Welche Rolle  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten bei diesen komplexen Zell-Zell-Interaktionen spielen, ist nicht bekannt. Folgende Fragen sind von besonderem Interesse: Durch welche Zytokine werden  $\gamma\delta$  T-Zellen aktiviert und in Anwesenheit welcher Zytokine exprimieren sie das Integrin  $\alpha^E\beta_7$ , mit dem sie dann an das Adhäsionsmolekül E-Cadherin auf Epithelzellen binden können? Durch Sekretion welcher Zytokine wirken sie immunmodulatorisch und durch Sekretion welcher Substanzen möglicherweise antimikrobiell oder zytotoxisch?

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten sich durch definierte Zytokine aktivieren lassen. Hierzu gehören IL-2, IL-7 und IL-15, während andere Interleukine wie IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-12 oder IL-13 keine Wirkung hatten. In Anwesenheit der Interleukine 2, 7 und 15 reagierten die  $\gamma\delta$  T-Zellen mit Proliferation bei gleichzeitiger Zunahme ihrer Granularität und Viabilität.

Die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  auf humanen  $\gamma\delta$  T-Zellen konnte *in vitro* bestätigt werden. Ein geringer Anteil von 1,8 % der aus dem venösen Vollblut isolierten  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten exprimiert das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  direkt nach der Isolierung. Nach 5 Tagen Inkubation ohne die Anwesenheit von Stimulanzen stieg dieser Anteil nur unwesentlich auf 2,8 %. In Gegenwart der aktivierend wirkenden Interleukine IL-2 und IL-15 in Kombination mit den Stimulanzen anti-CD3-Ak und TGF- $\beta_1$  exprimierten die  $\gamma\delta$  T-Zellen nach 5 Tagen Inkubation zu 55,6 % bzw. 58,7 % das Integrin  $\alpha^E\beta_7$ . Im Zeitverlauf wurden nach 7 Tagen Inkubation in Anwesenheit von IL-15 und TGF- $\beta_1$  maximale Werte von 69,0 % gemessen. Die zur Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  notwendige Anwesenheit der verschiedenen Zytokine bei teilweise zusätzlicher Stimulation der  $\gamma\delta$  T-Zellen über den CD3-Rezeptor ist nun im Zusammenhang mit den bisher bekannten Modellen des Immunsystems zu sehen und zu interpretieren.

Mittels Genchipanalyse konnte die Synthese von Rezeptoren, Zytokinen und Enzymen in  $\gamma\delta$  T-Zellen nachgewiesen werden. Es muss diskutiert werden, welche funktionellen Eigenschaften des  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten sich hieraus ableiten lassen.

## 5.2 Betrachtung der verwendeten Materialien und Methoden

### 5.2.1 Humanes Vollblut von gesunden Probanden als Isolationsmedium

Die in dieser Arbeit analysierten  $\gamma\delta$  T-Zellen wurden aus dem venösen Vollblut von gesunden Spenderinnen und Spendern gewonnen. Die Spenderinnen und Spender waren zwischen 20 und 30 Jahre alt. Falls sich die  $\gamma\delta$  T-Zellen von sehr viel älteren oder sehr viel jüngeren Personen in ihrer Funktion verglichen mit denjenigen junger Erwachsener unterscheiden sollten, würden diese Unterschiede in dieser Arbeit nicht erfasst werden. Dies gilt insbesondere für Kleinkinder, bei denen die Prägung der T-Lymphozyten durch den Thymus

noch nicht abgeschlossen und das Verhältnis oder  $\gamma\delta$  T-Zelluntergruppen zueinander zu Gunsten der V $\delta$ 1-Zellen verschoben ist (Haas et al., 1993). In dieser Arbeit zeigte sich jedoch bei den untersuchten  $\gamma\delta$  T-Zelluntergruppen kein wesentlicher Unterschied bezüglich der Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$ . Es darf daher vermutet werden, dass die Ergebnisse bei sehr viel älteren und jüngeren Probanden ähnlich ausgefallen wären.

Die Isolierung der  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem venösen Vollblut ist im Gegensatz zu einer möglichen Isolierung aus der bronchoalveolären Lavage eine relativ untersucherunabhängige Methode. Die  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten unterliegen im Blut, welches größtenteils frei von Erregern und Reizstoffen ist, sehr viel weniger exogenen Faktoren als die  $\gamma\delta$  T-Zellen im Epithelgewebe. Gerade die  $\gamma\delta$  T-Zellen in den Schleimhäuten der Atemwege sind durch temporäre subklinische virale oder bakterielle Infekte sowie durch inhalierte Reizstoffe recht unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt und könnten in ihrem Verhalten und ihrer Reaktionsbereitschaft dadurch beeinflusst werden. Bei Untersuchungen von  $\gamma\delta$  T-Zellen aus der BAL könnten deshalb die Ergebnisse heterogener ausfallen als bei denjenigen  $\gamma\delta$  T-Zellen, welche aus dem venösen Vollblut isoliert worden sind. Andererseits muss aber auch berücksichtigt werden, dass sich die gemessenen Eigenschaften der  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem venösen Vollblut nicht ohne Weiteres auf die der epithelialen  $\gamma\delta$  T-Zellen übertragen lassen. Eine Reifung oder Präaktivierung der  $\gamma\delta$  T-Zellen beim Einwandern in die Epithelien aus dem Blut wäre denkbar. Ein solcher Reifungsprozess ist für  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten bisher jedoch nicht beschrieben worden.

### 5.2.2 Positive magnetische Zellseparation

Bei der Isolierung mittels magnetischer Beads ist einerseits die erreichte Reinheit und andererseits eine potentielle Beeinflussung der  $\gamma\delta$  T-Zellen durch den Isolierungsvorgang zu betrachten. Es konnte gezeigt werden, dass das im Blut vorhandene Verhältnis der verschiedenen  $\gamma\delta$  T-Zelluntergruppen durch die Isolierung nicht verändert wurde. Die zur Isolierung verwendeten Antikörper banden wie vom Hersteller angegeben an die unterschiedlichen  $\gamma\delta$  T-Zelluntergruppenrezeptoren mit gleicher Affinität. Es wurden Reinheiten zwischen 94 % und 98 % gemessen. Hierbei ist zu bedenken, dass eine unspezifische Bindung der zur Isolierung verwendeten Beads an Zellen ohne  $\gamma\delta$  T-Zellrezeptor, wie z. B. Monozyten, zu einer Verunreinigung führen könnte, die bei der

Bestimmung der Reinheit nicht auffallen würde. Laut Herstellerangaben binden die Beads über die monoklonalen anti- $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor-Antikörper hochspezifisch an die T-Zellrezeptoren der  $\gamma\delta$  T-Zellen. Beim Betrachten und Auszählen der isolierten Zellen im Durchlichtmikroskop wurden keine Monozyten oder Granulozyten gefunden. Die gemessenen Reinheiten können als valide angesehen werden.

Als wesentlicher Punkt bei der positiven magnetischen Zellseparation ist ferner zu beachten, dass die isolierten  $\gamma\delta$  T-Zellen methodisch bedingt alle mit anti- $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor-Antikörpern besetzt sind. Inwieweit die  $\gamma\delta$  T-Zellen dadurch in ihrem Verhalten beeinflusst werden, ist nicht bekannt. Eine mögliche Beeinflussung hängt u. a. davon ab, an welchen Teil des  $\gamma\delta$  T-Zellrezeptors der Antikörper bindet und ob durch diese Bindung eine Signaltransduktion ausgelöst wird. Hierzu gibt es keine Herstellerangaben.

Wie im Kapitel 4.1.4 bereits erläutert, ist bei den isolierten Zellen in Kultur von einer temporären Besetzung der  $\gamma\delta$  T-Zellrezeptoren mit Antikörpern auszugehen. Es ist sowohl eine Aktivierung als auch eine Hemmung der  $\gamma\delta$  T-Zellen, welche u. a. die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  beeinflusst haben könnte, durch diese Bindung denkbar. Eine aktivierende oder in Bezug auf die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  primende Wirkung war in den durchgeführten Untersuchungen allerdings nicht zu beobachten. Die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  konnte in Anwesenheit der entsprechenden Zytokine auch bei den  $\gamma\delta$  T-Zellen der Tumorzelllinie „Loucy“, bei denen die  $\gamma\delta$  T-Zellrezeptoren nicht mit Antikörpern besetzt waren, nachgewiesen werden. Von  $\gamma\delta$  T-Hybridomzellen ist bekannt, dass durch anti- $\gamma\delta$  T-Zellrezeptor-Antikörper die spontane IL-2-Produktion und die Reaktivität auf exogene Antigene unterdrückt werden können (O'Brien et al., 1989; Wilde et al., 1992). Demnach könnte eine initiale Hemmung der  $\gamma\delta$  T-Zellen durch die zur Isolierung verwendeten Antikörper eine verzögerte Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  zur Folge gehabt haben. *In vivo* könnte das bedeuten, dass die  $\gamma\delta$  T-Zellen nach entsprechender Stimulation das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  möglicherweise schon nach einigen Stunden und nicht erst nach einigen Tagen exprimieren. Ein durch die Separationstechnik bedingter hemmender Effekt auf die hier untersuchten  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten kann nicht ausgeschlossen werden.

### 5.2.3 Inkubation der $\gamma\delta$ T-Zellen

Durch eine relativ geringe Zelldichte der  $\gamma\delta$  T-Zellen in Kultur wurde versucht, eine Beeinflussung der Zellen und damit auch der Messergebnisse durch einen zu hohen Nährstoffverbrauch mit Ansammlung saurer Stoffwechselprodukte im Medium zu vermeiden. Erst bei sehr viel höheren Zellkonzentrationen änderte sich nach einigen Tagen der pH-Wert im Medium messbar, was durch den Farbumschlag des dem Medium zugesetzten Indikators Phenolrot kenntlich gemacht wurde.

Idealerweise sollten die  $\gamma\delta$  T-Zellen in Kultur nur den Zytokinen, welche dem Inkubationsmedium zugegeben wurden, ausgesetzt sein. Es ist jedoch anzunehmen, dass die  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten ggf. selbst Zytokine sezernierten, welche über autostimulatorische Mechanismen die Messergebnisse beeinflusst haben könnten. Obwohl die Zelldichte in Kultur relativ gering gehalten wurde, könnte man dennoch argumentieren, dass die Zellen sich am Boden der Kulturplatten absetzten und teilweise in Zellhaufen dicht gedrängt zusammenlagen. Aus der Genchipanalyse geht hervor, dass die mit IL-15 und TGF- $\beta_1$  stimulierten  $\gamma\delta$  T-Zellen selber das Zytokin TGF- $\beta_1$  exprimierten. Eine Autostimulation, ähnlich wie dies bei aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen durch IL-2-Sekretion geschieht, ist denkbar. Inwieweit diese autologe TGF- $\beta_1$ -Produktion in den durchgeführten Versuchen die Messergebnisse hinsichtlich der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression beeinflusste, ist schwer abzuschätzen. Insbesondere bei den Ansätzen ohne Zusatz von TGF- $\beta_1$  könnte dies zu einer Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression geführt haben, die ohne die autologe Produktion von TGF- $\beta_1$  in diesem Maße nicht vorhanden gewesen wäre. Andererseits darf man annehmen, dass bei der Stimulation *in vivo* vergleichbare autokrine Mechanismen wirksam sind.

## 5.3 $\gamma\delta$ T-Zellen im Blut und im Epithel

### 5.3.1 Zirkulation der $\gamma\delta$ T-Zellen im Blut

Leukozyten sind zur amöboiden Bewegung fähig. Sie können die Kapillarwand durchwandern, sich im Gewebe fortbewegen oder auch wieder ins Blut zurückkehren. Nur ein kleiner Teil der Leukozyten hält sich vorübergehend im strömenden Blut auf. Die weitaus meisten Leukozyten befinden sich außerhalb der Strombahn dort, wo sie in den verschiedenen



Gewebe und Organen definierte Funktionen wahrnehmen. Die Zahl der Leukozyten im menschlichen Blut beträgt beim gesunden Erwachsenen ca. 5 bis  $10 \times 10^9$  je Liter. Die Leukozyten werden in Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten eingeteilt, wobei die Lymphozyten etwa einen Anteil von 30 % und Monozyten einen Anteil von etwa 6 % ausmachen, welche zusammen auch als mononukleäre Zellen bezeichnet werden (Schiebler et al., 1995a). Demnach dürften aus 108 ml Blut etwa 2 bis  $4 \times 10^8$  mononukleäre Zellen zu isolieren sein. Mittels der Ficoll-Paque<sup>®</sup>-Dichtezentrifugation konnten etwa 1 bis  $2 \times 10^8$  mononukleäre Zellen aus dem venösen Vollblut isoliert werden.

In der Literatur wird der Anteil der  $\gamma\delta$  T-Zellen an der gesamten Lymphozytenpopulation mit etwa 4 % bis 6 % angegeben (Haas et al., 1993; Fujii et al., 1997). Bezogen auf die mononukleären Zellen, aus denen die  $\gamma\delta$  T-Zellen mittels magnetischer Zellseparation isoliert wurden, machten die  $\gamma\delta$  T-Zellen in dieser Arbeit einen Anteil von etwa 2 % aus. Dies entspricht einem Anteil von 2,5 % an der Lymphozytengesamtpopulation (etwa 80 % der mononukleären Zellen sind Lymphozyten, s. o.). Damit wurden etwa nur die Hälfte der laut Literaturangaben im Blut vorhandenen  $\gamma\delta$  T-Zellen isoliert. Durchflusszytometrische Messungen bestätigten, dass nur etwa 2 % der isolierten mononukleären Zellen einen  $\gamma\delta$  T-Zellrezeptor aufwiesen. Das jüngere Alter der Probanden, verglichen mit den Probanden bei den Untersuchungen von Haas et al. (1993) und Fujii et al. (1997), oder die möglicherweise nur grob separierende Ficoll-Paque<sup>®</sup>-Dichtezentrifugation könnten eine Erklärung für den relativ geringeren Anteil an isolierten  $\gamma\delta$  T-Zellen sein.

Die gemessenen Untergruppenverhältnisse mit einem Anteil von etwa 80 % V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 T-Zellen und etwa 9 % V $\delta$ 1 T-Zellen stimmten mit denen in der Literatur angegebenen Werten von 50 % bis 90 % für V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 T-Zellen und 1 % bis 20 % für V $\delta$ 1 T-Zellen (altersabhängig, erhöhte Werte bei Kleinkindern mit noch aktivem Thymus) überein (Kabelitz, 1993). Für V $\delta$ 3 T-Zellen gab es keine Angaben. In den Untersuchungen dieser Arbeit wiesen die isolierten  $\gamma\delta$  T-Zellen einen Anteil von durchschnittlich 1,3 % V $\delta$ 3 T-Zellen auf.

Die Lebensdauer von Lymphozyten beträgt je nach Art und Funktion einige Tage bis zu mehreren Jahren (z. B. in Form von T-Gedächtniszellen). T-Lymphozyten zirkulieren nach Erwerb ihrer Immunkompetenz im Thymus jeweils für kurze Zeit in der Blutbahn. Dort haben sie einen Anteil von 65 % bis 75 % an der Lymphozytengesamtpopulation. Der überwiegende

Anteil der T-Lymphozyten hält sich jedoch nicht im Blut, sondern in lymphatischen Organen und Geweben auf (Schiebler et al. 1995b).  $\gamma\delta$  T-Zellen scheinen ihre Hauptfunktion in den Epithelien und Schleimhäuten wahrzunehmen, da sie dort in sehr viel höheren Konzentrationen als in anderen Geweben nachgewiesen wurden. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wiesen die aus dem Blut isolierten  $\gamma\delta$  T-Zellen ohne Zusatz von Zytokinen zum Medium keine wesentliche Proliferation auf und starben nach etwa 6 bis 7 Tagen in Kultur. Ähnliches dürfte für die im Blut zirkulierenden  $\gamma\delta$  T-Zellen gelten, sofern sie dort nicht durch entsprechende Zytokine aktiviert werden. Eine rasche Migration der  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut ins Epithelgewebe ist zu vermuten.

### 5.3.2 Transmigration der $\gamma\delta$ T-Zellen vom Blut ins Epithel

Lymphozyten sind wie andere Leukozyten auch zur amöboiden Bewegung fähig. Sie können die Kapillarwand durchwandern, sich im Gewebe fortbewegen oder auch wieder ins Blut zurückkehren. Bei Granulozyten ist diese Diapedese oder Transmigration recht gut erforscht und wird in verschiedene Phasen eingeteilt. Durch Chemo- und Zytokine aktiviert binden diese an Adhäsionsmoleküle von Kapillarendothelien und verlassen anschließend das Gefäßlumen, indem sie zwischen den Endothelzellen hindurch in die extrazelluläre Matrix immigrieren. Die Kommunikation zwischen Leukozyten und Endothelzellen bei dieser komplexen Zell-Zell-Interaktion geschieht u. a. durch Ausstoß von Zytokinen.

Um die Basalmembran, welche die Kapillaren umgibt, zu penetrieren, reichen Zytokine allein jedoch nicht aus. Es müssen Enzyme sezerniert werden, welche in der Lage sind, das Protein Laminin der Lamina rara externa, die Kollagenfasern Typ IV der Basallamina, das Protein Fibronectin der Lamina rara interna und die Kollagenfasern Typ III (retikuläre Fasern) der Lamina fibroreticularis zu spalten. Neutrophile und eosinophile Granulozyten und auch Makrophagen sezernieren hierzu die Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9), welche auch als 92-kDa-Gelatinase bezeichnet wird (McDonnell et al., 1999; Corbel et al., 2000; Vu & Werb, 2000).

Ob  $\gamma\delta$  T-Zellen auf die gleiche Art und Weise aus den Kapillaren emigrieren und welche Enzyme sie dabei sezernieren, ist nicht bekannt. Die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$ , über das die  $\gamma\delta$  T-Zellen an das Adhäsionsmolekül E-Cadherin auf Epithelzellen binden, könnte bei der initialen Adhärenz an das Kapillarendothel ebenfalls eine Rolle spielen. Es wurde beobachtet,

dass T-Lymphozyten, die das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimieren, an intestinale mikrovaskuläre Endothelzellen über einen E-Cadherin-unabhängigen Mechanismus binden können (Strauch et al., 2001). Das Lymphozyten-endotheliale-epitheliale-Zelladhäsionsmolekül (LEEP-CAM) könnte hier als Bindungspartner für das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  fungieren (Agace et al., 2000). In der Genchipanalyse wurde u. a. untersucht, welche Enzyme die  $\gamma\delta$  T-Zellen synthetisieren. Die Matrix-Metalloproteinasen 3, 10, 11 (Stromelysin 1 bis 3) und 7 (Matrilysin) und die Membran-Typ-Matrix-Metalloproteinasen 1, 2, 4 und 5 wurden von den  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten unabhängig von ihrer Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression nicht synthetisiert. Die Matrix-Metalloproteinasen 2, 9 und 12 (72-kDa-Gelatinase, 92-kDa-Gelatinase und Makrophagen-Elastase), die ebenfalls die Proteine der Basalmembranen spalten können, wurden in der Genchipanalyse chiptechnisch bedingt nicht untersucht. Ob diese Matrix-Metalloproteinasen von  $\gamma\delta$  T-Zellen im Rahmen der Transmigration synthetisiert werden, ist somit nach wie vor unklar. Die ausgeprägte Synthese des Gewebsinhibitors für Metalloproteinasen ('tissue inhibitor of metalloproteinases', TIMP) deutet aber eher auf eine Suppression von Metalloproteinasen durch  $\gamma\delta$  T-Zellen hin.

Um schließlich in das Epithel einzuwandern, muss von den  $\gamma\delta$  T-Zellen eine weitere Basalmembran, die epitheliale Basalmembran, überwunden werden. Hier könnte die Matrix-Metalloprotease 2 (MMP-2), welche auch als 72-kDa-Gelatinase (s. o.) oder Progelatinase A bezeichnet wird, zur Spaltung von Basalmembran-Komponenten und zur Diapedese der  $\gamma\delta$  T-Zellen beitragen. Die MMP-2 besitzt ein ähnliches Substratspektrum wie die 92-kDa-Gelatinase MMP-9 und wird von Epithelzellen sezerniert (Corbel et al., 2000). Es wäre denkbar, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen Zytokine freisetzen, welche durch die Basalmembran diffundieren und Epithelzellen zum Ausstoß der MMP-2 stimulieren, wodurch die epitheliale Basalmembran aufgelöst werden würde.

### 5.3.3 Die Eigenschaften der $\gamma\delta$ T-Zellen im Epithel

Über die Eigenschaften der  $\gamma\delta$  T-Zellen im Epithel ist bisher wenig bekannt. Es wird angenommen, dass das Epithelgewebe der eigentliche Aufenthaltsort der  $\gamma\delta$  T-Zellen ist, da sie hier verglichen mit anderen Geweben um ein Vielfaches höher konzentriert vorliegen.  $\alpha\beta$  T-Lymphozyten und B-Lymphozyten halten sich hingegen bevorzugt in den peripheren lymphatischen Organen auf. Den  $\gamma\delta$  T-Zellen wird eine Funktion bei der „first line“-Abwehr

zugeschrieben, da sie, lokalisiert in den Schleimhäuten und Epithelien, sehr früh mit inkorporierten und das Epithelgewebe infiltrierenden Antigenen in Kontakt treten. Diese epitheliale Immunprotektion durch  $\gamma\delta$  T-Zellen muss sich grundsätzlich von der hochspezialisierten Immunreaktion der  $\alpha\beta$  T-Zellen in den peripheren lymphatischen Organen unterscheiden.  $\gamma\delta$  T-Zellen besitzen im Gegensatz zu  $\alpha\beta$  T-Zellen weder CD4- noch CD8-Rezeptoren und sind damit nicht in der Lage, antigenpräsentierende Zellen von den übrigen Körperzellen an Hand der klassischen MHC-II- bzw. MHC-I-Moleküle voneinander zu unterscheiden. Die Zahl der unterschiedlichen Antigene, auf die verschiedene  $\gamma\delta$  T-Zellklone spezifisch reagieren könnten, ist durch die im Vergleich zu den  $\alpha\beta$  T-Zellen sehr beschränkte Variabilität des T-Zellrezeptors limitiert. Entwicklungsgeschichtlich betrachtet, könnten die  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten eine frühe Form des spezifischen Immunsystems darstellen. Die im spezifischen Immunsystem auf verschiedene hochspezialisierte Zellen verteilten Funktionen werden von  $\gamma\delta$  T-Zellen möglicherweise weniger spezialisiert wahrgenommen, wobei sie zugleich ähnliche antimikrobielle Eigenschaften wie die Zellen des phylogenetisch älteren unspezifischen Immunsystems besitzen könnten. In zahlreichen Untersuchungen wurde gezeigt, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen sowohl antibakterielle, antivirale als auch antitumoröse Eigenschaften besitzen (Saunders et al., 1998; Lafarge et al., 2001; Zheng et al., 2001). Aber auch bei allergischen Reaktionen (Jahnsen et al., 1998) und autoimmunen Prozessen (Robak et al., 2001) scheinen sie eine Rolle zu spielen. Wie diese immunmodulatorischen und zytotoxischen Reaktionen der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten ablaufen und mit welchen Zellen sie dabei interagieren, ist bisher nicht bekannt.

Wenn auch nicht die  $\gamma\delta$  T-Zellen im Epithel direkt analysiert wurden, so lassen doch die in dieser Arbeit *in vitro* gemessenen Ergebnisse Rückschlüsse auf das entzündliche Mikromilieu in Epithelien und Schleimhäuten zu. Im Folgenden soll zunächst auf die Zytokine, die zu einer Aktivierung der  $\gamma\delta$  T-Zellen führten, näher eingegangen werden. In Hinblick auf die Zellinteraktion zwischen  $\gamma\delta$  T-Zellen und Epithelzellen ist die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  von zentraler Bedeutung, da über dieses Integrin die  $\gamma\delta$  T-Zellen an das E-Cadherin der Epithelzellen binden. Das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  fungiert für die intraepithelialen Lymphozyten als sog. „Homing-Rezeptor“. Einerseits sind die an der Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  beteiligten Zytokine und Mediatoren von Interesse, andererseits müssen auch die von den  $\gamma\delta$  T-Zellen synthetisierten Substanzen genauer betrachtet werden, da sich hiervon möglicherweise antimikrobielle und immunmodulatorische Eigenschaften der  $\gamma\delta$  T-Zellen ableiten lassen.

## 5.4 Wirkung von Interleukinen auf $\gamma\delta$ T-Lymphozyten

### 5.4.1 Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen durch die Interleukine 2, 7 und 15

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in Anwesenheit der Interleukine 2, 7 und 15 die Zellgröße und Granularität der  $\gamma\delta$  T-Zellen zunahm, ihre Viabilität sich verlängerte und die Zellen *in vitro* eindeutige Zeichen der Proliferation zeigten. Es konnten  $\gamma\delta$  T-Zellhaufen am Boden der Mikrotiterplatten und eine erhöhte Zelldichte bei der durchflusszytometrischen Analyse nachgewiesen werden. Die Zellgröße und die Granularität der  $\gamma\delta$  T-Zellen nahm ebenfalls zu. Man kann von einer Aktivierung der  $\gamma\delta$  T-Zellen durch die Interleukine 2, 7 und 15 sprechen. Dieses deutet darauf hin, dass  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten, die im Rahmen einer Entzündungsreaktion aktiviert werden, mit Zellen interagieren, welche diese Interleukine freisetzen. Folglich wäre eine Interaktion mit aktivierten IL-2 sezernierenden  $CD4^+$  T-Helfer-Lymphozyten denkbar. Da  $\gamma\delta$  T-Zellen selbst zur Produktion von IL-2 fähig sind, wie in Versuchen mit abgetöteten Mykobakterien gezeigt werden konnte (Janis et al., 1989), ist auch eine Autostimulation der  $\gamma\delta$  T-Zellen über eine autologe IL-2-Produktion in Betracht zu ziehen. Mit dieser Eigenschaft würden die  $\gamma\delta$  T-Zellen den  $CD4^+$  T-Helfer-Zellen ähneln (vgl. Abbildung 5.1). IL-2 wird auch als T-Zell-Wachstumsfaktor ('T-cell growth factor', TCGF) bezeichnet; die wachstumsfördernde Eigenschaft von IL-2 gilt folglich nicht nur für  $\alpha\beta$  T-Zellen (Kjeldsen-Kragh et al., 1993), sondern auch für  $\gamma\delta$  T-Zellen.

IL-15 scheint ähnlich wie IL-2 auf  $\gamma\delta$  T-Zellen zu wirken. In der Literatur wird eine relativ höhere Beeinflussbarkeit von Viabilität und Proliferation der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten durch IL-15 als durch IL-2 beschrieben (Chu et al., 1999). IL-15 wird hauptsächlich durch Zellen des unspezifischen Immunsystems, wie z. B. Monozyten und neutrophile Granulozyten gebildet und wirkt als aktivierender und viabilitätsverlängernder Faktor auf T-Lymphozyten (Li et al., 2001). Es wird vermutet, dass besonders in der frühen Phase der Immunreaktion, wenn IL-2 sezernierende Zellen noch nicht rekrutiert worden sind, IL-15 für die Aktivierung der  $\gamma\delta$  T-Zellen verantwortlich ist (Garcia et al., 1998).

Bei Patienten mit verschiedenen rheumatischen (Suzuki et al., 2001) sowie Lungen-erkrankungen (Zissel et al., 2000) wurden erhöhte Serum-Spiegel von IL-15 bzw. eine erhöhte IL-15-Synthese durch Zellen der bronchoalveolären Lavage nachgewiesen. Besonders hohe IL-15-Spiegel wurden bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen, die durch eine

interstitielle Pneumonitis kompliziert wurden (Suzuki et al., 2001) und bei Patienten mit Tuberkulose oder aktiver Sarkoidose (Zissel et al., 2000) gemessen. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass die bei den aufgeführten Entzündungen vorliegenden erhöhten IL-15-Spiegel zu einer Aktivierung von  $\gamma\delta$  T-Zellen führen können. Welche Rolle die Aktivierung der  $\gamma\delta$  T-Zellen bei diesen Entzündungen spielt, bleibt allerdings unklar.

Auch IL-7 zeigte in den Versuchen dieser Arbeit eine ähnliche aktivierende Wirkung auf  $\gamma\delta$  T-Zellen wie IL-2 oder IL-15. Die Zellen wiesen Zeichen der Proliferation auf, ihre Zellgröße und Granularität nahm deutlich zu und sie verloren deutlich später ihre Viabilität. IL-7 wird hauptsächlich von Fibroblasten und Stromazellen des Knochenmarks produziert. Nach bisherigen Erkenntnissen wirkt IL-7 auf unreife, pluripotente Vorläuferzellen und trägt zur Differenzierung und Wachstum von B-Lymphozyten bei. Einige Studien an IL-7-knockout- und IL-7-Rezeptor-knockout-Mäusen zeigten, dass IL-7 eine wichtige Rolle im Reifungsprozess von  $\gamma\delta$  T-Zellen spielt (Candeias et al., 1997; Maeurer & Lotze, 1998; Ye et al., 2001). Inwieweit IL-7 auch auf reife humane  $\gamma\delta$  T-Zellen wirkt, war bisher nicht bekannt. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass auch reife  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten zu den Zielzellen des Wachstumsfaktors IL-7 gezählt werden müssen.

Der IL-7-Rezeptor wurde bei den  $\alpha^E\beta_7$ -positiven und den  $\alpha^E\beta_7$ -negativen  $\gamma\delta$  T-Zellen nach den Daten der Genchipanalyse gleichermaßen synthetisiert. Bei den Rezeptoren für die Interleukine IL-2 und IL-15 nahm die Rezeptor-Synthese hingegen mit Expression des  $\alpha^E\beta_7$ -Antigens ab. Da die Stimulation mit IL-2, anti-CD3-Ak und TGF- $\beta_1$  bzw. mit IL-15 und TGF- $\beta_1$  zu einer deutlichen Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  auf  $\gamma\delta$  T-Zellen führte, könnte die Down-Regulation der Interleukin-Rezeptor-Synthese im Sinne einer negativen Rückkopplung gewertet werden. Bei der Synthese des TGF- $\beta_1$ -Rezeptors und des TGF- $\beta$ -Rezeptor-interagierenden-Protein-1 bestand zwischen den  $\alpha^E\beta_7$ -positiven und den  $\alpha^E\beta_7$ -negativen  $\gamma\delta$  T-Zellen kein wesentlicher Unterschied.

#### 5.4.2 Interleukin-9-Rezeptor-Synthese, allergische Reaktionen und Asthma bronchiale

Die Daten der Genchipanalyse lassen vermuten, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen einen Rezeptor für IL-9 besitzen, der offensichtlich bei den  $\alpha^E\beta_7$ -positiven Zellen in geringerem Maße als bei den  $\alpha^E\beta_7$ -negativen  $\gamma\delta$  T-Zellen synthetisiert wird. IL-9 gilt als Wachstumsfaktor für T-Zellen und Mastzellen und wird von T-Zellen gebildet (Demoulin & Renauld, 1998). Allergische

Entzündungen und atopisches Asthma bronchiale sind mit einer erhöhten Expression von IL-9 im Epithelgewebe assoziiert. Hohe IL-9-Spiegel führen zur Infiltration von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen in die Epithelien (Ying et al., 2002).  $\gamma\delta$  T-Zellen könnten ähnlich auf die Anwesenheit von IL-9 reagieren. Einige Arbeiten deuten darauf hin, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen eine Rolle bei allergischen Reaktionen (Jahnsen et al., 1998) und beim Asthma bronchiale (Holt & Sly, 1999; Bai et al., 2001) spielen. Eine Aktivierung der  $\gamma\delta$  T-Zellen, wie dies bei IL-2, IL-7 oder IL-15 beobachtet wurde, ließ sich mit IL-9 jedoch nicht nachweisen.

Wenn in Anwesenheit von IL-9, z. B. bei allergischen Reaktionen,  $\gamma\delta$  T-Zellen ähnlich wie eosinophile Granulozyten und Mastzellen in das Epithelgewebe infiltrieren (Ying et al., 2002), würden sie sich mit Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  durch die geringere Synthese des IL-9-Rezeptors der weiteren IL-9-Wirkung entziehen. Im Zusammenhang mit der Adhäsion an Epithelzellen wäre eine solche Reaktion mit Beendigung der Migration sinnvoll. Laut Genchipanalyse besitzen  $\gamma\delta$  T-Zellen zum Teil ähnliche Eigenschaften wie Mastzellen und eosinophile Granulozyten:

Wie auch Mastzellen und basophile Granulozyten besitzen  $\gamma\delta$  T-Zellen, welche das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  nicht exprimieren, offenbar einen hochaffinen IgE-Rezeptor für den Fc-Teil des Immunglobulins E (FcERI). Somit können  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten über diesen Rezeptor, wie es von Mastzellen und basophilen Granulozyten bekannt ist, den zytophilen Antikörper IgE an ihrer Oberfläche binden. Wenn zwei benachbarte IgE-Moleküle durch Bindung von Antigen vernetzt werden, schütten Mastzellen neben Histamin und Heparin zahlreiche Entzündungsmediatoren (z. B. Leukotriene  $C_4$ ,  $D_4$  und  $E_4$ ) sowie chemotaktische Peptide aus, die neutrophile und eosinophile Granulozyten anlocken. Insbesondere bei Überempfindlichkeitsreaktionen vom anaphylaktischen Typ spielen diese Stoffe eine Rolle. Darüber hinaus hat IgE als agglutinierender Antikörper wahrscheinlich eine Funktion bei der Abwehr von Parasiten, da sich nach Wurminfektionen erhöhte IgE-Spiegel finden. Bei Infektionen mit Schleimhautparasiten wie *Schistosoma* (Raziuddin et al., 1992a) und *Leishmania donovani* (Raziuddin et al., 1992b) könnte eine antiparasitäre Funktion der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten möglicherweise IgE-vermittelt erfolgen. Ob die  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten über oberflächengebundene IgE-Antikörper spezifisch Antigene erkennen und wie sie auf einen solchen Antigenkontakt reagieren, muss in weiteren Arbeiten untersucht werden.

Eine interessante Verbindung zwischen  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten bildet die Synthese des Neurotoxins EDN ('eosinophil derived neurotoxin'). Auch dessen Synthese hängt offensichtlich mit der Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  zusammen, da lediglich die  $\gamma\delta$  T-Zellen, welche das Integrin nicht exprimierten, das Neurotoxin synthetisierten. Das EDN, auch „RNase 2“ genannt, führt u. a. zu einer ribonukleolytischen Zerstörung von extrazellulären RNA-Viren, wie am Beispiel vom RS-Virus ('respiratory syncytial virus') gezeigt werden konnte (Domachowske et al., 1998; Rosenberg & Domachowske 1999). Dass  $\gamma\delta$  T-Zellen über ribonukleolytische Mechanismen ähnlich wie eosinophile Granulozyten antiviral wirken, war bisher nicht bekannt. Warum die  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten mit Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  diese Fähigkeit verlieren, ist jedoch unklar.

#### 5.4.3 Synthese des Interleukin-4-Rezeptors

In der Genchipanalyse konnte eine Synthese des Rezeptors für IL-4 unabhängig von der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression festgestellt werden. Ebenso wie die Anwesenheit von IL-9 führte auch die Anwesenheit von IL-4 weder zu einer Aktivierung der  $\gamma\delta$  T-Zellen noch zu einer gesteigerten Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$ . IL-4, welches hauptsächlich von  $CD4^+$  T-Helfer-Lymphozyten, aktivierten Mastzellen und basophilen Granulozyten synthetisiert wird, bewirkt bei B-Lymphozyten einen „Klassenswitch“ mit Umstellung der synthetisierten Ig-Klasse auf IgE und wirkt bei T-Lymphozyten als Differenzierungs- und Wachstumsfaktor. Bei Monozyten hingegen verhindert die Anwesenheit von IL-4 eine Aktivierung und Endothelzellen werden zur Expression von Zelladhäsionsmolekülen (VCAM-1) veranlasst. Bei diesen recht heterogenen Wirkungen von IL-4 auf die verschiedenen Zielzellen ist völlig unklar, in welcher Weise  $\gamma\delta$  T-Zellen durch IL-4 beeinflusst werden. Hierüber ist bisher nichts bekannt.

Der Interleukin-4-Rezeptor bildet mit den Rezeptoren für die Interleukine 2, 7, 9 und 15 eine Zytokin-Rezeptor-Familie, die durch eine gemeinsame  $\gamma$ -Kette der trimerischen Rezeptoren charakterisiert ist. Die Rezeptoren für IL-2 und IL-15 besitzen zusätzlich noch dieselbe  $\beta$ -Kette (Li et al., 2001; Richter et al., 2002). Interleukin-Rezeptoren, welche nicht zu dieser Zytokin-Rezeptor-Familie gehören, wurden von den  $\gamma\delta$  T-Zellen nicht synthetisiert.



## 5.5 Expression des Integrins $\alpha^E\beta_7$ auf humanen $\gamma\delta$ T-Lymphozyten

### 5.5.1 Relevante Zytokine und Mediatoren

In der vorgelegten Arbeit wurden die isolierten humanen  $\gamma\delta$  T-Zellen in Anwesenheit verschiedener Zytokine und Mediatoren inkubiert. Bei den Entzündungsreaktionen, an denen  $\gamma\delta$  T-Zellen beteiligt sind, wird das komplexe Zusammenspiel verschiedener Entzündungszellen wesentlich durch die im entzündlichen Mikromilieu vorhandenen Zytokine bestimmt. Diese Zytokine werden auf ganz bestimmte Reize von den einzelnen Entzündungszellen sezerniert und können sehr spezifisch die Funktion anderer Entzündungszellen beeinflussen. Welche Zytokine zu einer Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  auf  $\gamma\delta$  T-Zellen führen, war bisher jedoch nicht bekannt. Ebenso wenig waren die hierbei interagierenden Zellen bekannt, wodurch ggf. Rückschlüsse auf zu untersuchende Zytokine möglich gewesen wären. In einer Art Screening-Verfahren wurden die isolierten  $\gamma\delta$  T-Zellen in Anwesenheit verschiedener Zytokine inkubiert. Um mögliche synergistische Wirkungen zu erfassen, wurden die Zellen u. a. auch mit mehreren Zytokinen gleichzeitig inkubiert.

Die in Kapitel 5.4 beschriebenen auf  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten aktivierend wirkenden Interleukine 2, 7 und 15 hatten neben ihrem pro-proliferativen Einfluss auch einen stimulatorischen Effekt bzgl. der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression auf  $\gamma\delta$  T-Zellen. Der Anteil Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierender  $\gamma\delta$  T-Zellen konnte, verglichen mit der Kontrolle, von etwa 3 % auf etwa 10 % in Anwesenheit von IL-2 oder IL-7 bzw. auf etwa 14 % in Gegenwart von IL-15 nach 5 Tagen Inkubation signifikant gesteigert werden. IL-15 erhöhte die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  im Vergleich zu den beiden anderen Interleukinen am stärksten mit statistisch grenzwertig signifikantem Unterschied.

Wie bereits erwähnt, wurde eine Inkubationszeit von 5 Tagen gewählt. Diese Inkubationszeit schien zur Erfassung stimulierend wirkender Substanzen geeignet, da die Expression eines Oberflächen-Rezeptors bzw. Integrins mit den vorgeschalteten Schritten der mRNA-Synthese und der ribosomalen Proteinsynthese einige Stunden bis Tage dauern kann. Die Kinetik der  $\alpha^E\beta_7$ -Expression zeigte, dass bei Messungen zu früheren Zeitpunkten, verglichen mit der Messung nach 5 Tagen, der Anteil der Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierenden  $\gamma\delta$  T-Zellen geringer war. Die Analyse der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression im Zeitverlauf in Anwesenheit der Zytokine IL-15 und TGF- $\beta_1$  verdeutlichte die Kinetik und bestätigte, dass der Messzeitpunkt nach

5 Tagen auch zum quantitativen Vergleich der verschiedenen Stimulanzen gut geeignet war. In Abwesenheit der Interleukine 2, 7 und 15 wiesen die  $\gamma\delta$  T-Zellen in den verschiedenen Ansätzen eine begrenzte Viabilität auf und gingen nach 6 bis 7 Tagen in Kultur zugrunde. Messungen der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression zu einem späteren Zeitpunkt erschienen deshalb nicht sinnvoll.

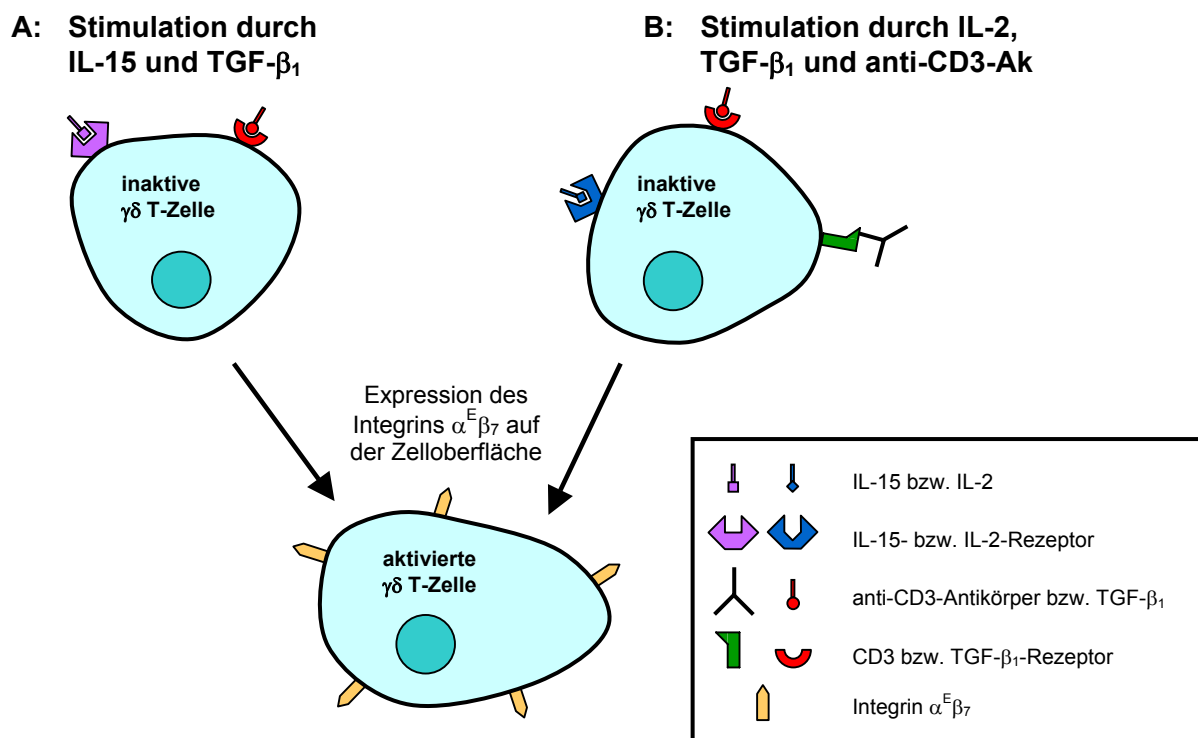
Neben den Interleukinen 2, 7 und 15 hatte das Zytokin TGF- $\beta_1$  ebenso wie der anti-CD3-Ak einen geringen stimulatorischen Effekt auf die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$ . In Anwesenheit von TGF- $\beta_1$  oder anti-CD3-Ak exprimierten nach 5 Tagen Inkubation etwa 6 % der  $\gamma\delta$  T-Zellen das Integrin  $\alpha^E\beta_7$ . Verglichen mit der Kontrolle war der stimulatorische Effekt bzgl. der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression sowohl von TGF- $\beta_1$  als auch vom anti-CD3-Ak signifikant. Die Kombination von TGF- $\beta_1$  und anti-CD3-Ak führte zu einer additiven Steigerung der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression auf etwa 9 %. Die beiden Stimulanzen TGF- $\beta_1$  und anti-CD3-Ak wirkten bzgl. der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression auf  $\gamma\delta$  T-Zellen synergistisch.

Die ebenfalls untersuchten Interleukine 3, 4, 5, 9, 10, 12 und 13 und die Lymphokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  beeinflussten weder in alleiniger Anwesenheit noch in Kombination mit den o. g. Stimulanzen die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$ . Es wurden keine aktivierenden Eigenschaften wie etwa bei den Interleukinen 2, 7 und 15 beobachtet. Das Verhältnis der  $\gamma\delta$  T-Zelluntergruppen zueinander blieb unbeeinflusst.

Der Zusatz von anti-CD3-Ak zu den in Anwesenheit der Interleukine 2, 7 oder 15 aktivierten  $\gamma\delta$  T-Zellen zeigte keine weitere Steigerung der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression. Dagegen führte die Anwesenheit von TGF- $\beta_1$  bei den Ansätzen mit den Interleukinen 2, 7 und 15 jeweils zu einer Steigerung der  $\alpha^E\beta_7$ -Expression verglichen mit den Interleukin-Ansätzen ohne TGF- $\beta_1$ . Bei gleichzeitiger Anwesenheit von IL-15 und TGF- $\beta_1$  exprimierten nach 5 Tagen Inkubation etwa 60 % der  $\gamma\delta$  T-Zellen das Integrin  $\alpha^E\beta_7$ . Bei dieser Stimulation wurde bei weiteren Messungen eine maximale Integrin-Expression mit  $\alpha^E\beta_7$ -Anteilen von 70 % nach etwa 7 bis 8 Tagen gemessen.

Die Ko-Stimulation mit IL-2, TGF- $\beta_1$  und anti-CD3-Ak führte nach 5 Tagen Inkubation ebenfalls zu einem hohen Anteil von etwa 60 % an Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierenden Zellen. Die Kombination der Stimulanzen IL-2, TGF- $\beta_1$  und anti-CD3-Ak hatte bzgl. der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -

Expression auf  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten einen ähnlichen Effekt wie die der Stimulanzen IL-15 und TGF- $\beta_1$ . Die bei den Ansätzen mit IL-2 und TGF- $\beta_1$  für die Integrin-Expression wichtige Ko-Stimulation mit anti-CD3-Ak war bei Stimulation mit IL-15 und TGF- $\beta_1$  nicht notwendig und hatte auch keinen Einfluss auf die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$ . Die Vermutung, dass durch IL-15 dieselbe Signaltransduktion wie durch IL-2 kombiniert mit anti-CD3-Ak ausgelöst wird, erwies sich aufgrund der deutlich unterschiedlichen Integrin-Expression bei den Ansätzen ohne die Anwesenheit von TGF- $\beta_1$  als nicht richtig. Vielmehr muss von einem komplexen Zusammenspiel der Zytokine und Mediatoren bei der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression ausgegangen werden, wobei die supraadditive Wirkung der Stimulanzen weder bei der Kombination von IL-2, TGF- $\beta_1$  und anti-CD3-Ak noch bei der Kombination der Stimulanzen IL-15 und TGF- $\beta_1$  aus den Einzelwirkungen der Stimulanzen abzuleiten war.



**Abbildung 5.2:** Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  auf der Zelloberfläche humaner  $\gamma\delta$  T-Zellen. Schematische Darstellung der beiden Aktivierungswege, welche zu einer deutlichen Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  führen. A: Aktivierung durch IL-15 und gleichzeitige Stimulation der  $\gamma\delta$  T-Zelle durch TGF- $\beta_1$ . B: Aktivierung durch IL-2 und gleichzeitige Stimulation der  $\gamma\delta$  T-Zelle durch TGF- $\beta_1$  und anti-CD3-Antikörper.

*In vitro* führte sowohl die Stimulation mit IL-15 und TGF- $\beta_1$  als auch die Stimulation mit

IL-2, TGF- $\beta_1$  und anti-CD3-Ak bei etwa 60 % der inkubierten  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten nach 5 Tagen zu einer Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$ . In der bronchoalveolären Lavage von Patienten mit fibrosierenden Lungenerkrankungen exprimierten die analysierten  $\gamma\delta$  T-Zellen zu einem ähnlich hohen Anteil das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  (Kroegel et al., unveröffentlicht). Bei diesen Erkrankungen könnten die in Abbildung 5.2 dargestellten Aktivierungswege eine Rolle spielen.

Mittels PCR wurde die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  indirekt über die Gen-Transkription bestätigt. Nach 24 Stunden Inkubation wurde bei der Stimulation mit IL-15 kombiniert mit TGF- $\beta_1$  die relativ höchste cDNA-Menge registriert. In den Proben mit nur 4 Stunden Inkubation waren nur minimale cDNA-Mengen nachweisbar. Weitere Messungen von unserer Arbeitsgruppe mit 4, 8, 24 und 48 Stunden in Anwesenheit von IL-15 kombiniert mit TGF- $\beta_1$  zeigten, dass das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  in den Ansätzen mit einer Inkubationszeit von 24 Stunden maximal synthetisiert wurde (Workalemahu et al., 2001). Auch die Kontrolle ohne Zusätze zeigte in der PCR nach 24 Stunden Inkubation eine deutliche Synthese des Integrins  $\alpha^E\beta_7$ . Dies könnte möglicherweise auf eine Autostimulation durch das Lymphokin TGF- $\beta_1$  zurückzuführen sein, das laut Genchipanalyse von den  $\gamma\delta$  T-Zellen selbst synthetisiert wird. Insgesamt waren die PCR-Ergebnisse mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie, insbesondere wenn man die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  auf der Zelloberfläche nach nur 1 bis 2 Tagen Inkubation betrachtet (s. Abbildung 4.16), gut vereinbar.

Bei allen Ansätzen exprimierten nach 5 Tagen Inkubation die einzelnen  $\gamma\delta$  T-Zelluntergruppen zu gleichen Anteilen das Integrin  $\alpha^E\beta_7$ . Keine Untergruppe zeichnete sich durch eine besonders hohe oder besonders niedrige Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  aus. Dies lässt vermuten, dass die V $\gamma$ 9, V $\delta$ 1, V $\delta$ 2 und V $\delta$ 3 T-Zellen neben dem CD3-Rezeptor auch bezüglich der Rezeptoren für IL-2, IL-7, IL-15 und TGF- $\beta_1$  relativ ähnlich ausgestattet sind.

Durch die Stimulanzen, die zu einer Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  führten, wurde der relative Anteil der einzelnen Untergruppen an der Gesamtpopulation der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten beeinflusst. Die im venösen Vollblut mit 8,7 % bzw. 1,3 % relativ gering vertretenen Subtypen V $\delta$ 1 und V $\delta$ 3 wiesen nach 5 Tagen Inkubation unter bestimmten Bedingungen im Mittel deutlich höhere Anteile von bis zu 22,1 % (IL-15 + anti-CD3-Ak + TGF- $\beta_1$ ) bzw. 6,9 % (IL-15 + anti-CD3-Ak) auf. Insgesamt kann man sagen, dass in Anwesenheit der

Interleukine IL-7 und IL-15 sich der Anteil an V $\delta$ 1<sup>+</sup> und V $\delta$ 3<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T-Zellen erhöhte, während sich der V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2-Anteil erniedrigte. Möglicherweise hatte auch IL-2 einen leichten supprimierenden Effekt auf die V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 T-Zellfraktion. TGF- $\beta$ <sub>1</sub> hatte bis auf die statistisch nicht signifikante V $\delta$ 1-Suppression keinen Einfluss auf die Verteilung der  $\gamma\delta$  T-Zellsubtypen. Die enge funktionelle Bindung zwischen IL-2-Rezeptor, CD3-Komplex und TGF- $\beta$ <sub>1</sub>-Rezeptor, wie bereits bei der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression deutlich wurde, zeigte sich auch bei der Beeinflussung der  $\gamma\delta$  T-Zelluntergruppenverhältnisse. In Abwesenheit der Interleukine führte die Stimulation mit anti-CD3-Ak oder TGF- $\beta$ <sub>1</sub> zu einer Abnahme der V $\delta$ 1 Zellen. In Gegenwart von IL-2 kombiniert mit anti-CD3-Ak oder TGF- $\beta$ <sub>1</sub> zeigte sich hingegen eine deutliche Zunahme des V $\delta$ 1-Anteils, obwohl IL-2 in Abwesenheit von anti-CD3-Ak und TGF- $\beta$ <sub>1</sub> den Anteil an V $\delta$ 1 Zellen nicht beeinflusste.

Da die Untergruppenanteile von V $\delta$ 1, V $\delta$ 2 und V $\delta$ 3 T-Zellen in ihrer Summe in den einzelnen Ansätzen zwischen 97,6 % (IL-2 + TGF- $\beta$ <sub>1</sub>) und 70,1 % (IL-15 + anti-CD3-Ak) variierten, lässt dies auf weitere V $\delta$ -Subtypen mit äußerst variablem Anteil schließen. Für die Analyse weiterer V $\delta$ -Untergruppen standen jedoch keine entsprechenden Antikörper zur Verfügung. Für die übrigen V $\gamma$ -Untergruppen gilt entsprechendes, es konnte lediglich der Subtyp V $\gamma$ 9 bestimmt werden. Unter der Annahme, dass die Subtypen mit einem geringen Anteil an der  $\gamma\delta$  T-Zell-Gesamtpopulation, wie beispielsweise die V $\delta$ 1 und V $\delta$ 3 T-Zellen, ebenso wie die übrigen Zellen bestimmte Funktionen im Körper erfüllen, könnten diese Untergruppen mit ihren großen Variabilitäten in besonderem Maße immunmodulatorisch wirken.

Hinsichtlich ihrer Proliferation unterschieden sich die  $\gamma\delta$  T-Zellen des  $\alpha^E\beta_7$ -Phänotyps nicht von den  $\alpha^E\beta_7$ -negativen Zellen. Alle  $\gamma\delta$  T-Zellen wurden in Gegenwart von IL-15 und TGF- $\beta$ <sub>1</sub> gleichermaßen aktiviert und wiesen nach etwa 6 Tagen Inkubation eine maximale Zellteilungsrate auf. Folglich kamen die hohen Anteile Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierender  $\gamma\delta$  T-Zellen nicht durch selektive Proliferation  $\alpha^E\beta_7$ -positiver Zellen zustande.  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten exprimieren unter geeigneter Stimulation das Integrin  $\alpha^E\beta_7$ , wobei dies unabhängig von ihrem Proliferationsverhalten geschieht.

Der zur Stimulation verwendete anti-CD3-Ak gehört nicht zur Gruppe der Zytokine, da er in dieser Form im Körper nicht vorkommt und so nicht als Botenstoff fungiert. Er soll *in vitro* ähnlich wie diejenigen Moleküle eine Signaltransduktion bewirken, welche *in vivo* im Rahmen der Zell-Zell-Interaktion an den CD3-Rezeptor von T-Lymphozyten binden. Der CD3-Komplex ist auf der Zelloberfläche von T-Zellen eng mit dem T-Zellrezeptor assoziiert. Dieser Komplex besteht aus einer CD3 $\gamma$ -, einer CD3 $\delta$ -, zwei CD3 $\epsilon$ -Ketten und einem disulfid-gebundenen  $\xi$ -Ketten-Homodimer (Delves & Roitt, 2000). Bei  $\alpha\beta$  T-Lymphozyten führt eine Kreuzvernetzung mit dem T-Zellrezeptor, welche bei der Bindung an MHC-Moleküle auftritt, zu Phosphorylisierungsprozessen im zytoplasmatischen Anteil des CD3-Komplexes. Die Signaltransduktion wirkt aktivierend und hat eine Transkription unterschiedlicher Gensequenzen im Zellkern zur Folge (Delves & Roitt, 2000).  $\gamma\delta$  T-Zellen binden im Gegensatz zu CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T-Zellen keine klassischen MHC-Moleküle. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass auch bei  $\gamma\delta$  T-Zellen – bei entsprechender Stimulation – über den CD3-Rezeptor MHC-unabhängig Aktivierungsvorgänge ausgelöst werden können. Die der Arbeit zugrunde liegenden Experimente bestätigen diese Annahme und zeigen, dass die antikörpervermittelte Stimulation des CD3-Komplexes in Anwesenheit von IL-2 und TGF- $\beta_1$  zu einer deutlichen Steigerung der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression auf  $\gamma\delta$  T-Zellen führt.

Das Zytokin TGF- $\beta_1$  scheint bei der Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  auf humanen  $\gamma\delta$  T-Zellen eine zentrale Rolle zu spielen, da ohne TGF- $\beta_1$  maximal 13,7 % der  $\gamma\delta$  T-Zellen (bei Stimulation mit IL-15) das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierten. Diese Vermutung wird, zumindest für  $\alpha\beta$  T-Lymphozyten, von einigen neueren Studien gestützt, bei denen eine gesteigerte Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  im Zusammenhang mit erhöhten TGF- $\beta$ -Spiegeln beobachtet wurde (Hadley et al., 1999; Robertson et al., 2001a; Robertson et al., 2001b). Bei Patienten mit Idiopathischer Pulmonaler Fibrose und Sarkoidose wurde festgestellt, dass die alveolären Makrophagen zu einem hohen Anteil das Zytokin TGF- $\beta$  synthetisieren; die TGF- $\beta$ -Synthese war bei diesen Patienten verglichen mit der Kontrollgruppe deutlich erhöht (Guo et al., 1999). Wie bereits in Kapitel 5.4.1 erwähnt, wurden besonders hohe IL-15-Spiegel bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen, welche durch eine interstitielle Pneumonitis kompliziert wurden, beobachtet (Suzuki et al., 2001). Die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung, dass in Anwesenheit von IL-15 und TGF- $\beta_1$  humane  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimieren, lässt auf eine Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression bei fibrosierenden Lungenerkrankungen schließen und würde diese erklären.

### 5.5.2 Bedeutung und Funktion der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression

Im Folgenden sollen verschiedene Bereiche, bei denen die Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression von Bedeutung sein könnte, kurz zusammengefasst werden.

#### 5.5.2.1 Das Integrin $\alpha^E\beta_7$ als „Homing-Rezeptor“

Die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  spielt bei vielfältigen Reaktionen und Zell-Zell-Interaktionen eine Rolle. Über die Bindung des Integrins  $\alpha^E\beta_7$ , und damit auch der  $\gamma\delta$  T-Zellen an das Adhäsionsmolekül E-Cadherin auf Epithelzellen, fungiert das Integrin als sog. „Homing-Rezeptor“. Das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  trägt zur bevorzugten intraepithelialen Lokalisation der  $\gamma\delta$  T-Zellen bei. Wie bereits in Kapitel 5.3.2 im Zusammenhang mit der Transmigration erwähnt, kann das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  über einen E-Cadherin-unabhängigen Mechanismus auch an Adhäsionsmoleküle von Gefäßwänden binden (Strauch et al., 2001). Das Lymphozyten-endotheliale-epitheliale-Zelladhäsionsmolekül (LEAP-CAM) könnte hier als Bindungspartner für das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  fungieren (Agace et al., 2000). Die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  auf  $\gamma\delta$  T-Zellen ist folglich nicht nur in Epithelien und Schleimhäuten von besonderer Bedeutung, sondern könnte auch bei entzündlichen Gefäßwandveränderungen eine Rolle spielen.

#### 5.5.2.2 Die $\alpha^E\beta_7$ -vermittelte Bindung der $\gamma\delta$ T-Lymphozyten an Endothelzellen im Zusammenhang mit entzündlichen Gefäßwandveränderungen

In der Pathogenese der Arteriosklerose sind neben Monozyten bzw. Makrophagen auch T-Lymphozyten beteiligt. Nach einer initialen Endothelläsion werden im weiteren Verlauf auch tiefere Gefäßwandschichten geschädigt mit Proliferation und Veränderung der glatten Muskelzellen und unter Bildung einer fibrösen Matrix aus Kollagen und bestimmten Proteoglykanen.  $\gamma\delta$  T-Zellen werden u. a. durch Hitzeschock-Proteine aktiviert, welche von geschädigten Arterien freigesetzt werden (Heng & Heng, 1994). Das Hitze-Schock-Protein 60 konnte auf Endothelzellen und auf den glatten Muskelzellen von Aorta und Carotiden bei dahingehend untersuchten Probanden nachgewiesen werden, wohingegen kleinere Gefäße, welche weitaus weniger zu atherosklerotischen Veränderungen neigen, dieses Hitzeschock-Protein nicht aufwiesen (Kleindienst et al., 1993). Die Akkumulation von  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Übergangszone zwischen normaler Intima und den atherosklerotischen Frühläsionen (Stemme

et al., 1991; Kleindienst et al., 1993) spricht für eine Rolle der  $\gamma\delta$  T-Zellen besonders in der entzündlichen Frühphase der Arteriosklerose. Da das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  eine Bindung der  $\gamma\delta$  T-Zellen an die Adhäsionsmoleküle von Gefäßendothelzellen ermöglicht, ist in diesem Zusammenhang auch an eine pathogenetische Bedeutung der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expressionen bei Arteriosklerose zu denken. Über die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  auf Entzündungszellen bei atherosklerotischen Läsionen ist bisher nichts bekannt.

Die Genchipanalyse zeigte bei Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierenden  $\gamma\delta$  T-Zellen eine erhöhte Synthese des „endotheliale Monozyten aktivierenden Polypeptids II“ (EMAP II). Monozyten spielen in der Pathogenese der Arteriosklerose durch die Phagozytose von Lipiden, wodurch sie sich zu Schaumzellen wandeln, eine wichtige Rolle. Über die mit der  $\alpha^E\beta_7$ -Expression zusammenhängenden Synthese des EMAP II könnten  $\gamma\delta$  T-Zellen immunmodulatorisch auf Monozyten wirken und somit das entzündliche Mikromilieu bei der Arteriosklerose beeinflussen. Da EMAP II in Endothelzellen Apoptose auslöst (Schwarz et al. 1995; Tas & Murray, 1996) könnten aktivierte  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten auch über einen solchen Mechanismus zu einer Gefäßwandschädigung beitragen.

### 5.5.2.3 Das „endotheliale Monozyten aktivierende Polypeptid II“ (EMAP II)

Das von aktivierten  $\alpha^E\beta_7$ -positiven  $\gamma\delta$  T-Zellen synthetisierte EMAP II wirkt einerseits auf Monozyten und Makrophagen chemotaktisch und aktivierend, andererseits löst es in Endothelzellen Apoptose aus. Darüber hinaus induziert das Polypeptid bei Endothelzellen die Expression des Adhäsionsmoleküls P-Selectin (Tas & Murray, 1996). An dieses Adhäsionsmolekül können  $\gamma\delta$  T-Zellen mit Hilfe des P-Selectin-Glykoprotein-Liganden (SELPLG) binden. Dieser Ligand wurde laut Genchipanalyse sowohl von  $\alpha^E\beta_7$ -positiven als auch von  $\alpha^E\beta_7$ -negativen  $\gamma\delta$  T-Zellen gleichermaßen synthetisiert. Dieser Effekt könnte positiv auf eine Akkumulation von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten im Endothelgewebe wirken.

Über eine Thromboplastin-Freisetzung aus Granulozyten, Monozyten und Endothelzellen wirkt EMAP II pro-koagulativ. EMAP II gilt als potenter anti-angiogener Faktor für die Gefäßentwicklung in soliden Tumoren (Tas & Murray, 1996; Schwarz et al., 2000). Über die Sekretion von EMAP II könnten aktivierte  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten einerseits protektive antitumoröse Eigenschaften besitzen, andererseits könnte über diesen Mechanismus aber auch gesundes Gewebe im Rahmen einer Entzündungsreaktion geschädigt werden.



Da die  $\gamma\delta$  T-Zellen außerdem die pro-angiogenen Gegenspieler des EMAP II, den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) und das Angiopoietin-1 (Ang-1), synthetisierten, ist die EMAP-II-Synthese auch im Sinne einer angio-regulativen Funktion der  $\gamma\delta$  T-Zellen zu sehen. Insbesondere in der Morpho- und Angiogenese der Lunge könnten  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten eine Rolle spielen (Warburton et al., 2000).

#### 5.5.2.4 Serotonin- und Substanz-P-Rezeptor-Synthese bei $\alpha^E\beta_7$ -negativen $\gamma\delta$ T-Zellen

Die Genchipanalyse zeigte, dass  $\alpha^E\beta_7$ -negative  $\gamma\delta$  T-Zellen den Serotonin-Rezeptor 5-HT<sub>4</sub> und den Rezeptor für die Substanz P synthetisierten. Im Gegensatz dazu produzierten die  $\alpha^E\beta_7$ -positiven  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten diese Rezeptoren nicht. Der Serotonin-Rezeptor 5-HT<sub>4</sub> gehört zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Im Gastrointestinaltrakt wird beispielsweise über diesen Rezeptor eine Acetylcholinfreisetzung mit konsekutiver Motilitätssteigerung in Magen und Darm ausgelöst (Giertz et al., 1996). Über die Wirkung von Serotonin auf  $\gamma\delta$  T-Zellen ist bisher nichts bekannt.

Die zu den Tachykininen gehörende Substanz P wird häufig gemeinsam mit Serotonin gebildet und wirkt ähnlich wie Serotonin. Im Nervensystem des Darms erhöht sie über eine Acetylcholinfreisetzung die Darmmotilität. Substanz P wird aus den peripheren Endigungen von nozizeptiven Neuronen bei einer Verletzung, bei Hitze oder bei Kontakt mit bestimmten Stoffen freigesetzt und vermittelt eine neurogene Entzündung. In der Nachbarschaft bewirkt die freigesetzte Substanz P Vasodilatation, Erhöhung der Gefäßpermeabilität sowie Freisetzung von Histamin und Prostaglandinen aus Mastzellen. Die Freisetzung von Substanz P soll zur Migräne, zum Asthma und zur chronischen Arthritis beitragen (Starke, 1996). An diesen Entzündungsreaktionen beteiligte  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten würden sich mit Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  dem Einfluss von Substanz P und Serotonin entziehen. In diesem Zusammenhang ist auch die bereits im Rahmen der IL-9-Rezeptor-Synthese erwähnte Bindung von IgE an der Zelloberfläche von  $\alpha^E\beta_7$ -negativen  $\gamma\delta$  T-Zellen interessant. Eine IgE-vermittelte Aktivierung von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten wäre ebenso wie eine Stimulierung über Substanz P und Serotonin nach Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression nicht mehr möglich. Die möglicherweise chemotaktische Wirkung von IL-9 würde nachlassen. Zusammengenommen hat die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  auf  $\gamma\delta$  T-Zellen offenbar einen immunmodulatorischen Einfluss auf die Funktion der Zellen.

#### 5.5.2.5 Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -positive $\gamma\delta$ T-Zellen synthetisieren Pankreatische Elastase IIA

Eine der wesentlichen Erkenntnisse der Arbeit war die Synthese der Pankreatischen Elastase IIA bei den  $\alpha^E\beta_7$ -exprimierenden  $\gamma\delta$  T-Zellen der Tumorzelllinie „Loucy“ mittels Genchipanalyse. Mit Hilfe der PCR wurde die Synthese der Pankreatischen Elastase IIA bei  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten, die aus dem humanen Vollblut isoliert worden waren, verifiziert. Dabei war die cDNA der Pankreatischen Elastase IIA bei denjenigen  $\gamma\delta$  T-Zellen am deutlichsten darstellbar, die in Anwesenheit von IL-15 und TGF- $\beta_1$  das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierten. Die PCR ist ein hochspezifisches Verfahren zum Nachweis von mRNA, und die nachgewiesenen cDNA-Banden bestätigen, dass humane aus dem venösen Vollblut isolierte  $\gamma\delta$  T-Zellen die Fähigkeit besitzen, die Pankreatische Elastase IIA zu synthetisieren.

Ob die  $\gamma\delta$  T-Zellen bereits während oder erst nach Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  die Pankreatische Elastase IIA maximal synthetisieren, ist bisher nicht bekannt. Hierzu müssten weitere Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgen. Da synthetisierte Enzyme häufig in cytoplasmatischen Speichern angesammelt und für eine Ausschüttung bereitgehalten werden, könnte durch negative Rückkopplungsmechanismen die Neusynthese von Enzymen blockiert werden, falls die Speicher nicht geleert würden. Als Beispiel sei hier die humane Leukozyten-Elastase genannt, welche wie auch die Pankreatische Elastase IIA zur Familie der Serin-Proteasen gehört (Bode et al., 1989). Die auch als Neutrophilen-Elastase bezeichnete Leukozyten-Elastase wird nach ihrer Produktion in den cytoplasmatischen azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten zwischengespeichert, aus denen sie bei Bedarf wieder abgegeben werden kann. Der mRNA-Nachweis der Leukozyten-Elastase gelang bei diesen Zellen bisher nur im promyelozytischen Stadium der Granulozyten-Entwicklung, in reifen aus dem systemischen Blut isolierten neutrophilen Granulozyten ließ sich mittels PCR bisher keine mRNA-Synthese für die Leukozyten-Elastase nachweisen (Takahashi et al., 1988; Lee & Downey, 2001). In Analogie hierzu muss die PCR zum Nachweis der Pankreatischen Elastase IIA bei  $\gamma\delta$  T-Zellen mit einer gewissen Vorsicht betrachtet werden, denn die Methode lässt keine sicheren quantitativen Aussagen über das elastolytische Potential von  $\gamma\delta$  T-Zellen zu. Hier müssen Verfahren, die das Protein der Pankreatischen Elastase direkt oder die Elastase über Substrat-Umsatz-Messungen indirekt nachweisen, weitere Informationen liefern.

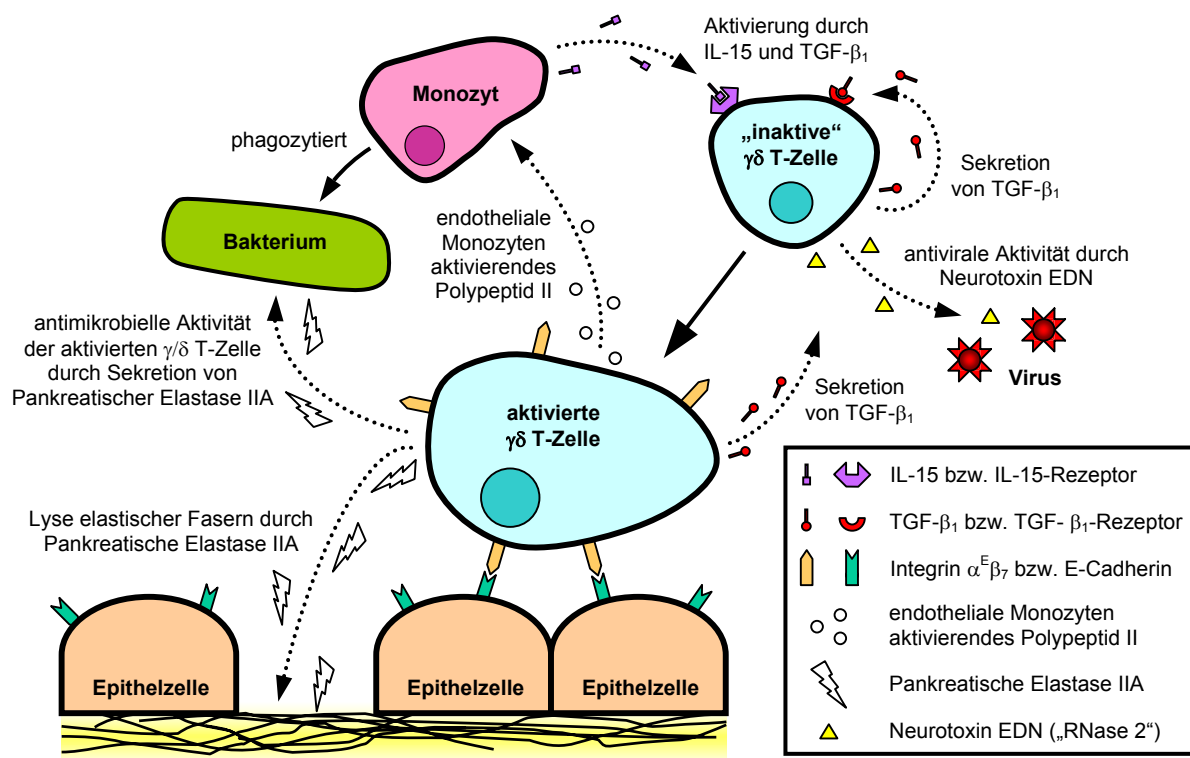
### 5.6 Der $\gamma\delta$ T-Lymphozyt als protektive antimikrobielle Immunzelle

Aus welchem Grund synthetisiert der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyt die Pankreatischen Elastase IIA? Zum einen erscheint eine Elastolyse zur Transmigration durch Gefäßwände, elastinreiches Lungengewebe und Basalmembranen durchaus sinnvoll. Andererseits ist aber auch bekannt, dass Elastasen ein breites Spektrum an antimikrobieller Aktivität besitzen (Gabay & Almeida, 1993). Die Leukozyten-Elastase ist z. B. in der Lage, das äußere Membran-Protein A auf der Zelloberfläche gram-negativer Bakterien (z. B. *Escherichia coli*) abzubauen (Belaouaj et al., 2000). Bei Untersuchungen mit Leukozyten-Elastase-knockout-Mäusen konnte zudem gezeigt werden, dass die Mäuse ohne funktionsfähige Elastase bei normaler Entwicklung der Leukozyten eine deutlich höhere Mortalität bei Infektionen mit gram-negativen Bakterien aufwiesen (Belaouaj et al., 1998) und anfälliger gegenüber Infektionen mit *Aspergillus fumigatus* waren (Tkalcevic et al., 2000). Ähnliche antimikrobielle Eigenschaften könnte die Pankreatische Elastase IIA besitzen und im Rahmen der Immunabwehr von Bedeutung sein. Dies würde dem  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten eine protektive Rolle zuschreiben.

Im Zusammenhang mit der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression auf  $\gamma\delta$  T-Zellen ist neben der Synthese der Pankreatischen Elastase IIA die gleichzeitig verstärkte Genexpression für das „endotheliale Monozyten aktivierende Polypeptid II“ (EMAP II) interessant. Das freigesetzte EMAP II wirkt u. a. chemotaktisch und aktivierend auf Monozyten und Makrophagen (Tas & Murray, 1996). Dies lässt auf eine Interaktion zwischen  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten und Monozyten / Makrophagen schließen. Die  $\alpha^E\beta_7$ -unabhängige Synthese des Makrophagen-spezifischen Kolonie-stimulierenden Faktors (CSF-1 / M-CSF) und des Makrophagen-Migration inhibierenden Faktors (MIF) durch  $\gamma\delta$  T-Zellen spricht ebenfalls für ein solches Zusammenspiel zwischen  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten und Makrophagen. Der Makrophagen-spezifische Kolonie-stimulierende Faktor gilt als Differenzierungs- und Wachstumsfaktor für Monozyten und Makrophagen (Sweet & Hume, 2003). Der Makrophagen-Migration inhibierende Faktor hemmt die Migration von Makrophagen und wird als wichtiger pro-inflammatorischer Modulator von Entzündungs- und Immunreaktionen verstanden (Baugh & Donelli 2003; Calandra & Roger 2003).

$\gamma\delta$  T-Zellen könnten im Zusammenspiel mit Monozyten bzw. Makrophagen folgendermaßen immunprotektiv wirken: Durch Sekretion von MIF üben  $\gamma\delta$  T-Zellen eine Migrationshemmung auf chemotaktisch angelockte Makrophagen aus, wodurch diese am

Entzündungsort akkumulieren. Zugleich wirkt der von den  $\gamma\delta$  T-Zellen freigesetzte CSF-1 bzw. M-CSF stimulierend auf Wachstum und Ausreifung der Makrophagen. Im Rahmen einer Entzündungsreaktion aktivierte  $\alpha^E\beta_7$ -positive  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten könnten durch Sekretion der Pankreatischen Elastase IIA direkt membranschädigend auf bestimmte bakterielle Erreger wirken. Auf diese Weise geschädigte Bakterien würden dann durch Monozyten bzw. Makrophagen phagozytiert werden. Hierbei könnte eine Aktivierung der Monozyten mittels EMAP II eine Rolle spielen. Nach diesem Modell würden  $\alpha^E\beta_7$ -positive  $\gamma\delta$  T-Zellen antibakterielle Eigenschaften besitzen, wohingegen  $\alpha^E\beta_7$ -negative  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten eine EDN-vermittelte antivirale Immunprotektion bewirken.



**Abbildung 5.3:** *Antimikrobielle Aktivität der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten in Abhängigkeit von der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression.* Durch IL-15 und TGF- $\beta_1$  aktivierte  $\gamma\delta$  T-Zellen exprimieren das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  auf ihrer Zelloberfläche. Durch Freisetzen von Pankreatischer Elastase IIA und Sekretion des „endotheliale Monozyten aktivierenden Polypeptids II“ (EMAP II) könnten aktivierte  $\gamma\delta$  T-Zellen im Rahmen der Immunprotektion membranschädigend auf Bakterien wirken und Monozyten bzw. Makrophagen zur Phagozytose stimulieren. Die Lyse elastischer Gewebefasern durch die Pankreatische Elastase IIA ist möglicherweise bei der Transmigration der  $\gamma\delta$  T-Zellen durch Gefäßwände, elastinreiches Lungengewebe und Basalmembranen von Bedeutung. Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -negative  $\gamma\delta$  T-Zellen besitzen durch Sekretion des ribonukleolytischen Neurotoxins EDN antivirale Eigenschaften, die sie offenbar mit Expression des Integrin  $\alpha^E\beta_7$  verlieren.

### **5.7 Pathogenetisches Modell der Lungengewebsschädigung durch $\gamma\delta$ T-Lymphozyten**

Elastische Fasern werden von den Fibroblasten hauptsächlich in der Embryonalperiode gebildet (Schiebler et al., 1995c). Es wurde gezeigt, dass die Fibroblasten neugeborener Ratten die Fähigkeit noch besitzen, die durch Elastase geschädigten elastischen Fasern der Lunge zu reparieren (Stone et al., 1997). Im Erwachsenenalter geht diese Fähigkeit mit sinkender Elastin-Synthese zunehmend verloren (Johnson et al., 1995), elastische Fasern werden nach ihrem Abbau, wenn Reparaturmechanismen nicht mehr ausreichen, durch funktionell inadäquate Kollagenfasern ersetzt. Verschiedene Faktoren beeinträchtigen die Reparatur geschädigter elastischer Fasern. Elastasen bauen nicht nur elastische Fasern ab, sondern hemmen auch die mRNA-Synthese für das zur Reparatur notwendige Tropoelastin in den pulmonalen Fibroblasten (Rich et al., 1996). Darüber hinaus kann Zigarettenrauch die Resynthese von Elastin nach Schädigung des Lungengewebes durch Elastasen behindern (Osman et al., 1985). Eine adäquate Elastin-Synthese ist für den Funktionserhalt von elastischen Geweben wie das der Lunge von entscheidender Bedeutung (Foster & Curtiss, 1990; Jacob et al., 2001). Vermutlich herrscht unter physiologischen Bedingungen ein Gleichgewicht zwischen Elastin-Abbau und Elastin-Resynthese.

Die Ergebnisse der Genchipanalyse zeigen, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen sich einerseits an der Elastin-Synthese beteiligen können, womit sie möglicherweise reparative Eigenschaften besitzen, andererseits aber auch durch die Synthese der Pankreatischen Elastase IIA elastolytisch wirken können. Diese Eigenschaften hängen mit der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression zusammen und werden durch diese vielleicht sogar bestimmt. Bei Entzündungsreaktionen könnte die Pankreatische Elastase IIA, wie dies bereits von anderen Elastasen bekannt ist, in erster Linie der mikrobiellen Immunabwehr dienen. Es ist jedoch auch denkbar, dass es bei bestimmten Entzündungen, beispielsweise bei chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen, zu einer inadäquaten übermäßigen Produktion der Pankreatischen Elastase IIA durch aktivierte Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierende  $\gamma\delta$  T-Zellen kommt. Bei längerdauerndem Einwirken der Elastase auf das elastinreiche Lungengewebe könnte dieses bei nicht ausreichender Elastin-Synthese irreversibel geschädigt werden. Die entstandenen Gewebsdefekte würden durch Narbengewebe mit entsprechender Deposition von Kollagenfasern ersetzt werden. Das pathologische Korrelat dieses Remodelling-Prozesses ist die Lungenfibrose.

### 5.8 Anwendung & Ausblick

Bei Patienten mit fibrosierenden Lungenerkrankungen wurde beobachtet, dass die  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten der bronchoalveolären Lavage zu einem großen Teil das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierten (Kroegel et al., unveröffentlicht). Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass  $\alpha^E\beta_7$ -positive  $\gamma\delta$  T-Zellen durch die Synthese der Pankreatischen Elastase IIA die elastischen Fasern des Lungengewebes schädigen können. Über eine solche Lungenparenchymschädigung, beispielsweise im Rahmen von Entzündungsreaktionen, könnten sich  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten direkt an der Pathogenese von pulmonalen Fibrosen beteiligen. Folgende Schlussfolgerungen lassen sich hieraus ableiten:

Die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  auf humanen  $\gamma\delta$  T-Zellen könnte bei unklaren interstitiellen Lungenerkrankungen von diagnostischem Wert sein. Eine durchflusszytometrische Analyse der Entzündungszellen der BAL und insbesondere die Messung der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression auf den lavagierten  $\gamma\delta$  T-Zellen würde möglicherweise ein frühzeitiges Erkennen von fibrosierenden Lungenerkrankungen zulassen. Eine Differenzierung verschiedener interstitieller Lungenerkrankungen an Hand der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression auf  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten ist denkbar, wobei die Expression des Integrin  $\alpha^E\beta_7$  auch von prognostischer Bedeutung sein könnte. Ähnliches dürfte auch für die mit der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression verbundenen Synthese der Pankreatischen Elastase IIA gelten.

Therapeutische Ansätze ergeben sich ebenfalls aus den dieser Arbeit zugrunde liegenden Ergebnissen. Da  $\gamma\delta$  T-Zellen in Anwesenheit von TGF- $\beta_1$  und IL-15 bzw. in Anwesenheit von TGF- $\beta_1$  und IL-2 bei zusätzlicher Stimulation über den CD3-Rezeptor das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  in besonderem Maße exprimierten, könnte bei fibrosierenden Lungenerkrankungen z. B. versucht werden, die Synthese dieser Zytokine zu hemmen bzw. ihre Wirkung zu blockieren. Es ist denkbar, dass hierdurch die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  auf den  $\gamma\delta$  T-Zellen und die damit verbundene Synthese der Pankreatischen Elastase IIA verringert werden kann. Entsprechende Substanzen könnten als inhalative Medikamente lokal appliziert werden, ohne das Immunsystem des gesamten Organismus wesentlich zu beeinflussen. Des Weiteren ist eine spezifische Blockierung der Pankreatischen Elastase IIA mit pharmakologischen Elastase-Inhibitoren in Betracht zu ziehen, um einer möglichen Destruktion von Lungengewebe entgegenzuwirken. Inhibitoren für die Makrophagen-Elastase und die Leukozyten-Elastase wurden im Tierversuch bei bleomycin-induzierter Fibrose bereits

erfolgreich getestet (Taooka et al., 1997; Corbel et al., 2001; Lang et al., 2001). Die Ergebnisse von derzeit laufenden klinischen Phase II / III Studien mit niedermolekularen pharmakologischen Elastase-Inhibitoren bei Patienten mit Lungenerkrankungen liegen noch nicht vor (Lee & Downey, 2001). Es bleibt abzuwarten, inwieweit die Pankreatische Elastase IIA, sezerniert von Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierenden  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten, zu einer Lungengewebsschädigung beiträgt und ob diese durch entsprechende Inhibitoren reduziert oder sogar unterdrückt werden kann.

## 6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung der  $\alpha^E\beta_7$ -Expression für die Funktion der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten zu analysieren, um damit die Zellbiologie dieser Zellen besser zu verstehen.  $\gamma\delta$  T-Zellen bilden eine Gruppe von T-Lymphozyten, bei denen sich der T-Zellrezeptor aus einer  $\gamma$ - und einer  $\delta$ -Kette zusammensetzt. Im Gegensatz zu  $\alpha\beta$  T-Zellen reichern sich  $\gamma\delta$  T-Zellen weniger im Blut oder den lymphatischen Organen an, sondern akkumulieren hauptsächlich in Epithelien und Schleimhäuten. Über die Bedeutung und Funktion der  $\gamma\delta$  T-Zellen und ihr Zusammenspiel mit anderen Entzündungszellen ist kaum etwas bekannt. Nach bisherigen Erkenntnissen unterscheiden sich  $\gamma\delta$  T-Zellen wegen ihrer andersartigen Rezeptorausstattung grundlegend von  $\alpha\beta$  T-Zellen. Daher lassen sich die bekannten Modelle für die immunologischen Reaktionen von  $\alpha\beta$  T-Lymphozyten nicht auf  $\gamma\delta$  T-Zellen übertragen. Über das transmembrane Adhäsionsmolekül  $\alpha^E\beta_7$  binden intraepitheliale Lymphozyten (IEL) an das E-Cadherin reifer Epithelzellen. Es wird vermutet, dass diese Bindung zur intraepithelialen Lokalisation von Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierenden Zellen beiträgt. Das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  wird deshalb auch als „Homing-Rezeptor“ bezeichnet. Obwohl  $\gamma\delta$  T-Zellen typischerweise im Epithelgewebe akkumulieren, ist die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  auf humanen  $\gamma\delta$  T-Zellen bisher nicht bekannt. Tierexperimentelle Untersuchungen (Braun et al., 1996) und unveröffentlichte Ergebnisse von Kroegel et al. deuten darauf hin, dass die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  auf  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten eine Rolle in der Pathogenese von fibrosierenden Lungenerkrankungen spielen könnte.

Zur Analyse der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression auf humanen  $\gamma\delta$  T-Zellen wurden diese mittels magnetischer Zellseparation aus dem venösen Vollblut von gesunden Probanden isoliert und anschließend in Kultur aufgenommen. Durchflusszytometrische Untersuchungen zeigten, dass nur etwa 2 % der isolierten  $\gamma\delta$  T-Zellen das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  exprimierten. Um zu ermitteln, welche Zytokine oder Stimulanzen zu einer Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  führen, wurden isolierte  $\gamma\delta$  T-Zellen in einer Art Screening-Verfahren in Anwesenheit verschiedener Substanzen für jeweils 5 Tage inkubiert und die Expression des  $\alpha^E\beta_7$ -Antigens durchflusszytometrisch bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass die Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  auf humanen  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten der integrierten Wirkung von TGF- $\beta_1$ , IL-2 und anti-CD3-



Antikörper oder des Zusammenwirkens von TGF- $\beta_1$  mit IL-15 bedarf. Dieses unerwartete Ergebnis lässt auf komplexe Zell-Zell-Interaktionen bei der Integrin- $\alpha^E\beta_7$ -Expression *in vivo* schließen. Nach 5 Tagen Inkubation exprimierten etwa 60 % der  $\gamma\delta$  T-Zellen das  $\alpha^E\beta_7$ -Antigen und nach 7 Tagen erreichte die Integrin-Expression ein Maximum von etwa 70 %.

Durch Anwendung dieser Resultate war es möglich, mittels Genchipanalyse das Proteinsynthesemuster von  $\alpha^E\beta_7$ -positiven  $\gamma\delta$  T-Zellen zu untersuchen. Dieser Ansatz ließ definierte funktionelle Eigenschaften der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten erkennen, die mit der Expression des Integrins  $\alpha^E\beta_7$  verbunden waren. Als Beispiele seien hier folgende wesentliche Teilergebnisse genannt: Die  $\gamma\delta$  T-Zellen synthetisierten  $\alpha^E\beta_7$ -unabhängig den Makrophagen-spezifischen Kolonie-stimulierenden Faktor (CSF-1) und den Makrophagen-Migration-Inhibierenden-Faktor (MIF). Das ribonukleolytische, antivirale Neurotoxin EDN wurde hingegen nur von den  $\alpha^E\beta_7$ -negativen  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten synthetisiert. Im Gegensatz zu  $\alpha^E\beta_7$ -negativen Zellen synthetisierten  $\alpha^E\beta_7$ -positive  $\gamma\delta$  T-Zellen das „endotheliale Monozyten aktivierende Polypeptid II“ (EMAP II) und das Enzym Pankreatische Elastase IIA.

Aktivierte  $\alpha^E\beta_7$ -positive  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten transmigrieren möglicherweise unter Synthese der Pankreatischen Elastase IIA durch Gefäßwände und durch das elastinreiche Lungenparenchym zu ihrem Wirkort im Epithel, wo sie dann über das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  an Epithelzellen binden. Im entzündlichen Mikromilieu könnte die Pankreatische Elastase IIA ähnlich wie die von neutrophilen Granulozyten produzierte Leukozyten-Elastase antimikrobiell wirken und damit zur unspezifischen Immunität beitragen. Neben dieser protektiven bzw. antientzündlichen Eigenschaft von aktivierten  $\alpha^E\beta_7$ -positiven  $\gamma\delta$  T-Zellen wäre auch eine Destruktion von elastischen Lungengerüstfasern durch eine übermäßige Elastase-Produktion denkbar. Über eine solche Lungengewebsschädigung mit anschließendem strukturellen Umbau des Interstitiums (Remodelling) könnten  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten bei der Pathogenese von Lungenfibrosen eine Rolle spielen.

## 7 Literatur

1. Agace WW, Higgins JM, Sadasivan B, Brenner MB, Parker CM. T-lymphocyte-epithelial-cell interactions: integrin  $\alpha^E$ (CD103) $\beta_7$ , LEEP-CAM and chemokines. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12:563-568.
2. Agostini C, Zambello R, Trentin L, Cerutti A, Bulian P, Crivellaro C, Cipriani A, Semenzato G.  $\gamma\delta$  T cell receptor subsets in the lung of patients with HIV-1 infection. *Cell Immunol* 1994; 153:194-205.
3. Asarnow DM, Kuziel WA, Bonyhadi M, Tigelaar RE, Tucker PW, Allison JP. Limited diversity of  $\gamma\delta$  antigen receptor genes of Thy-1<sup>+</sup> dendritic epidermal cells. *Cell* 1988; 55:837-847.
4. Augustin A, Kubo RT, Sim GK. Resident pulmonary lymphocytes expressing the  $\gamma\delta$  T-cell receptor. *Nature* 1989; 340:239-241.
5. Bai Y, Lin Y, He W, Chen Y, Ma Y. Analysis of the T cell receptor V $\delta$  region gene repertoire in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and peripheral blood of asthmatics. *Chin Med J* 2001; 114:1252-1257.
6. Baugh JA, Donnelly SC. Makrophage migration inhibitory factor: a neuroendocrine modulator of chronic inflammation. *J Endocrinol* 2003; 179:15-23.
7. Belaouaj A, Kim KS, Shapiro SD. Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase. *Science* 2000; 289:1185-1188.
8. Belaouaj A, McCarthy R, Baumann M, Gao Z, Ley TJ, Abraham SN, Shapiro SD. Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nat Med* 1998; 4:615-618.
9. Ben Ze'ev A. Cytoskeletal and adhesion proteins as tumor suppressors. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9:99-108.
10. Bode W, Meyer E Jr, Powers JC. Human leukocyte and porcine pancreatic elastase: X-ray crystal structures, mechanism, substrate specificity, and mechanism-based inhibitors. *Biochemistry* 1989; 28:1951-1963.
11. Boismenu R. Function of intestinal  $\gamma\delta$  T cells. *Immunol Res* 2000; 21:123-127.
12. Boismenu R, Feng L, Xia YY, Chang JC, Havran WL. Chemokine expression by intraepithelial  $\gamma\delta$  T cells. Implications for the recruitment of inflammatory cells to damaged epithelia. *J Immunol* 1996; 157:985-992.
13. Boller K, Vestweber D, Kemler R. Cell-adhesion molecule uvomorulin is localized in the intermediate junctions of adult intestinal epithelial cells. *J Cell Biol* 1985; 100:327-332.
14. Braun RK, Sterner-Kock A, Kilshaw PJ, Ferrick DA, Giri SN. Integrin  $\alpha^E\beta_7$  expression on BAL CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and  $\gamma\delta$  T-cells in bleomycin-induced lung fibrosis in mouse. *Eur Respir J* 1996; 9:673-679.
15. Braun RK, Schumann C, Foerster M, Grahmann PR, Haefner D, Kroegel C. Expression of  $\alpha^E\beta_7$  on CD4<sup>+</sup> BAL T lymphocytes in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 163:A831.
16. Brown DW, Furness J, Speight PM, Thomas GJ, Li J, Thornhill MH, Farthing PM. Mechanisms of binding of cutaneous lymphocyte-associated antigen-positive and  $\alpha^E\beta_7$ -positive lymphocytes to oral and skin keratinocytes. *Immunology* 1999; 98:9-15.
17. Calandra T, Roger T. Makrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:791-800.

18. Candeias S, Peschon JJ, Muegge K, Durum SK. Defective T-cell receptor  $\gamma$  gene rearrangement in interleukin-7 receptor knockout mice. *Immunol Lett* 1997; 57:9-14.
19. Carding SR, Egan PJ.  $\gamma\delta$  T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:336-345.
20. Cepek KL, Parker CM, Madara JL, Brenner MB. Integrin  $\alpha^E\beta_7$  mediates adhesion of T lymphocytes to epithelial cells. *J Immunol* 1993; 150:3459-3470.
21. Cepek KL, Shaw SK, Parker CM, Russell GJ, Morrow JS, Rimm DL, Brenner MB. Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the  $\alpha^E\beta_7$  integrin. *Nature* 1994; 372:190-193.
22. Cerf-Bensussan N, Jarry A, Brousse N, Lisowska-Groszpiere B, Griscelli C, Guy-Grand D. Monoclonal antibodies specific for human and rat intestinal lymphocytes. *Adv Exp Med Biol* 1987; 216A:483-491.
23. Chen ZW, Letvin NL.  $V\gamma 2V\delta 2^+$  T cells and anti-microbial immune responses. *Microbes Infect* 2003; 5:491-498.
24. Christmas TJ. Lymphocyte sub-populations in the bladder wall in normal bladder, bacterial cystitis and interstitial cystitis. *Br J Urol* 1994; 73:508-515.
25. Chu CL, Chen SS, Wu TS, Kuo SC, Liao NS. Differential effects of IL-2 and IL-15 on the death and survival of activated TCR  $\gamma\delta^+$  intestinal intraepithelial lymphocytes. *J Immunol* 1999; 162:1896-1903.
26. Corbel M, Boichot E, Lagente V. Role of gelatinases MMP-2 and MMP-9 in tissue remodeling following acute lung injury. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33:749-754.
27. Corbel M, Caulet-Maugendre S, Germain N, Molet S, Lagente V, Boichot E. Inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat. *J Pathol* 2001; 193:538-545.
28. Corps E, Carter C, Karecla P, Ahrens T, Evans P, Kilshaw P. Recognition of E-cadherin by integrin  $\alpha^E\beta_7$ : requirement for cadherin dimerization and implications for cadherin and integrin function. *J Biol Chem* 2001; 276:30862-30870.
29. D'Souza CD, Cooper AM, Frank AA, Mazzaccaro RJ, Bloom BR, Orme IM. An anti-inflammatory role for  $\gamma\delta$  T lymphocytes in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1997; 158:1217-1221.
30. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* 2000; 343:108-117.
31. Demoulin JB, Renauld JC. Interleukin 9 and its receptor: an overview of structure and function. *Int Rev Immunol* 1998; 16:345-364.
32. Domachowske JB, Bonville CA, Dyer KD, Rosenberg HF. Evolution of antiviral activity in the ribonuclease A gene superfamily: evidence for a specific interaction between eosinophil-derived neurotoxin (EDN/RNase 2) and respiratory syncytial virus. *Nucleic Acids Res* 1998; 26:5327-5332.
33. Ebert MP, Ademmer K, Muller-Ostermeyer F, Friess H, Buchler MW, Schubert W, Malfertheiner P.  $CD8^+CD103^+$  T cells analogous to intestinal intraepithelial lymphocytes infiltrate the pancreas in chronic pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1998; 93:2141-2147.
34. Ferchland H, Braun RK, Schumann C, Foerster M, Kroegel C. The expansion of  $CD103^+CD4^+$  T-lymphocytes in the bronchoalveolar compartment. Comparison between COPD with and without emphysema and bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:A695.
35. Ferrarini M, Ferrero E, Dagna L, Poggi A, Zocchi MR. Human  $\gamma\delta$  T cells: a nonredundant system in the immune-surveillance against cancer. *Trends Immunol* 2002; 23:14-18.

36. Fisch P, Moris A, Rammensee H, Handgretinger R. Inhibitory MHC class I receptors on  $\gamma\delta$  T cells in tumour immunity and autoimmunity. *Immunol Today* 2000; 21:187-191.
37. Foster JA, Curtiss SW. The regulation of lung elastin synthesis. *Am J Physiol* 1990; 259:L13-L23.
38. Fujihara T, Fujita H, Tsubota K, Saito K, Tsuzaka K, Abe T, Takeuchi T. Preferential localization of  $CD8^+ \alpha^E\beta_7^+$  T cells around acinar epithelial cells with apoptosis in patients with Sjogren's syndrome. *J Immunol* 1999; 163:2226-2235.
39. Fujii T, Kadota J, Mukae H, Kawakami K, Iida K, Kohno S.  $\gamma\delta$  T cells in BAL fluid of chronic lower respiratory tract infection. *Chest* 1997; 111:1697-1701.
40. Gabay JE, Almeida RP. Antibiotic peptides and serine protease homologs in human polymorphonuclear leukocytes: defensins and azurocidin. *Curr Opin Immunol* 1993; 5:97-102.
41. Garcia VE, Jullien D, Song M, Uyemura K, Shuai K, Morita CT, Modlin RL. IL-15 enhances the response of human  $\gamma\delta$  T cells to nonpeptide microbial antigens. *J Immunol* 1998; 160:4322-4329.
42. Gauldie J. Pro: Inflammatory mechanisms are a minor component of the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:1205-1206.
43. Giertz H, Flohé L, Göthert M, Peskar BA, Resch K. Mediatoren der Entzündung und Allergie. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 7. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996, pp. 327-329.
44. Giri JG, Kumaki S, Ahdieh M, Friend DJ, Loomis A, Shanebeck K, DuBose R, Cosman D, Park LS, Anderson DM. Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the  $\alpha$  chain of the IL-2 receptor. *EMBO J* 1995; 14:3654-3663.
45. Graeme-Cook F, Bhan AK, Harris NL. Immunohistochemical characterization of intraepithelial and subepithelial mononuclear cells of the upper airways. *Am J Pathol* 1993; 143:1416-1422.
46. Groh V, Porcelli S, Fabbi M, Lanier LL, Picker LJ, Anderson T, Warnke RA, Bhan AK, Strominger JL, Brenner MB. Human lymphocytes bearing T cell receptor  $\gamma\delta$  are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J Exp Med* 1989; 169:1277-1294.
47. Gumbiner B, Stevenson B, Grimaldi A. The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. *J Cell Biol* 1988; 107:1575-1587.
48. Guo Z, Cao B, Zhu Y, et A. The potential role of cytokines expression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 1999; 22:33-36.
49. Haas W, Pereira P, Tonegawa S.  $\gamma\delta$  cells. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:637-685.
50. Hadley GA, Bartlett ST, Via CS, Rostapshova EA, Moainie S. The epithelial cell-specific integrin, CD103 ( $\alpha^E$  integrin), defines a novel subset of alloreactive  $CD8^+$  CTL. *J Immunol* 1997; 159:3748-3756.
51. Hadley GA, Rostapshova EA, Gomolka DM, Taylor BM, Bartlett ST, Drachenberg CI, Weir MR. Regulation of the epithelial cell-specific integrin, CD103, by human  $CD8^+$  cytolytic T lymphocytes. *Transplantation* 1999; 67:1418-1425.
52. Happ MP, Kubo RT, Palmer E, Born WK, O'Brien RL. Limited receptor repertoire in a mycobacteria-reactive subset of  $\gamma\delta$  T lymphocytes. *Nature* 1989; 342:696-698.
53. Hatta K, Takagi S, Fujisawa H, Takeichi M. Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos. *Dev Biol* 1987; 120:215-227.

54. Havlir DV, Ellner JJ, Chervenak KA, Boom WH. Selective expansion of human  $\gamma\delta$  T cells by monocytes infected with live *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest* 1991; 87:729-733.
55. Havran WL, Allison JP. Origin of Thy-1<sup>+</sup> dendritic epidermal cells of adult mice from fetal thymic precursors. *Nature* 1990; 344:68-70.
56. Heng MK, Heng MC. Heat-shock protein 65 and activated  $\gamma\delta$  T cells in injured arteries. *Lancet* 1994; 344:921-923.
57. Higgins JM, Mandlebrot DA, Shaw SK, Russell GJ, Murphy EA, Chen YT, Nelson WJ, Parker CM, Brenner MB. Direct and regulated interaction of integrin  $\alpha^E\beta_7$  with E-cadherin. *J Cell Biol* 1998; 140:197-210.
58. Hirata N, Takeuchi K, Majima Y, Sakakura Y. The V $\delta$ 1 T cell receptor repertoire in human nasal mucosa. *Scand J Immunol* 2000; 52:380-384.
59. Holt PG, Sly PD.  $\gamma\delta$  T cells provide a breath of fresh air for asthma research. *Nat Med* 1999; 5:1127-1128.
60. Huck S, Dariavach P, Lefranc MP. Variable region genes in the human T-cell rearranging  $\gamma$  (TRG) locus: V-J junction and homology with the mouse genes. *EMBO J* 1988; 7:719-726.
61. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69:11-25.
62. Ikuta K, Kina T, MacNeil I, Uchida N, Peault B, Chien YH, Weissman IL. A developmental switch in thymic lymphocyte maturation potential occurs at the level of hematopoietic stem cells. *Cell* 1990; 62:863-874.
63. Islam D, Christensson B. Disease-dependent changes in T-cell populations in patients with shigellosis. *APMIS* 2000; 108:251-260.
64. Isogai S, Rubin A, Maghni K, Ramos-Barbon D, Taha R, Yoshizawa Y, Hamid Q, Martin JG. The effects of CD8<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T cells on late allergic airway responses and airway inflammation in rats. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:547-555.
65. Jacob MP, Sauvage M, Osborne-Pellegrin M. Regulation of elastin synthesis. *J Soc Biol* 2001; 195:131-141.
66. Jahnsen FL, Farstad IN, Aanesen JP, Brandtzaeg P. Phenotypic distribution of T cells in human nasal mucosa differs from that in the gut. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 18:392-401.
67. Jameson J, Ugarte K, Chen N, Yachi P, Fuchs E, Boismenu R, Havran WL. A role for skin  $\gamma\delta$  T cells in wound repair. *Science* 2002; 296:747-749.
68. Janis EM, Kaufmann SH, Schwartz RH, Pardoll DM. Activation of  $\gamma\delta$  T cells in the primary immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 1989; 244:713-716.
69. Johnson DJ, Robson P, Hew Y, Keeley FW. Decreased elastin synthesis in normal development and in long-term aortic organ and cell cultures is related to rapid and selective destabilization of mRNA for elastin. *Circ Res* 1995; 77:1107-1113.
70. Jones-Carson J, Balish E, Uehling DT. Susceptibility of immunodeficient gene-knockout mice to urinary tract infection. *J Urol* 1999; 161:338-341.
71. Joo YE, Rew JS, Choi SK, Bom HS, Park CS, Kim SJ. Expression of E-cadherin and catenins in early gastric cancer. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35:35-42.
72. Kabelitz D, Bender A, Prospero T, Wesselborg S, Janssen O, Pechhold K. The primary response of human  $\gamma\delta^+$  T cells to *Mycobacterium tuberculosis* is restricted to V $\gamma$ 9-bearing cells. *J Exp Med* 1991; 173:1331-1338.

73. Kabelitz D. Function and specificity of human  $\gamma\delta$ -positive T cells. *Crit Rev Immunol* 1992; 11:281-303.
74. Kabelitz D. Human  $\gamma\delta$  T lymphocytes. *Int Arch Allergy Immunol* 1993; 102:1-9.
75. Kanazawa H, Ishiguro Y, Munakata A, Morita T. Multiple accumulation of V $\delta$ <sup>2+</sup>  $\gamma\delta$  T-cell clonotypes in intestinal mucosa from patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2001; 46:410-416.
76. Karecla PI, Bowden SJ, Green SJ, Kilshaw PJ. Recognition of E-cadherin on epithelial cells by the mucosal T cell integrin  $\alpha$ M290 $\beta$ <sub>7</sub> ( $\alpha^E\beta_7$ ). *Eur J Immunol* 1995; 25:852-856.
77. Karecla PI, Green SJ, Bowden SJ, Coadwell J, Kilshaw PJ. Identification of a binding site for integrin  $\alpha^E\beta_7$  in the N-terminal domain of E-cadherin. *J Biol Chem* 1996; 271:30909-30915.
78. Kaufmann SH, Ladel CH. Role of T cell subsets in immunity against intracellular bacteria: experimental infections of knock-out mice with *Listeria monocytogenes* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Immunobiology* 1994; 191:509-519.
79. Kim DS, Lee KY, Yang WI, Han SJ, Hwang EH.  $\gamma\delta$  T lymphocytes in the BCG granulomatous lesions. *Yonsei Med J* 1996; 37:319-324.
80. Kjeldsen-Kragh J, Quayle AJ, Skallehgg BS, Sioud M, Forre O. Selective activation of resting human  $\gamma\delta$  T lymphocytes by interleukin-2. *Eur J Immunol* 1993; 23:2092-2099.
81. Kleindienst R, Xu Q, Willeit J, Waldenberger FR, Weimann S, Wick G. Immunology of atherosclerosis. Demonstration of heat shock protein 60 expression and T lymphocytes bearing  $\alpha\beta$  or  $\gamma\delta$  receptor in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1993; 142:1927-1937.
82. Kobayashi Y, Tycko B, Soreng AL, Sklar J. Transrearrangements between antigen receptor genes in normal human lymphoid tissues and in ataxia telangiectasia. *J Immunol* 1991; 147:3201-3209.
83. Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J, Toma H, Uchiyama T.  $\gamma\delta$  T cells provide innate immunity against renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2001; 50:115-124.
84. Koizumi H, Liu CC, Zheng LM, Joag SV, Bayne NK, Holoshitz J, Young JD. Expression of perforin and serine esterases by human  $\gamma\delta$  T cells. *J Exp Med* 1991; 173:499-502.
85. Kolopp-Sarda MN, Kohler C, De March AK, Bene MC, Faure G. Discriminative immunophenotype of bronchoalveolar lavage CD4 lymphocytes in sarcoidosis. *Lab Invest* 2000; 80:1065-1069.
86. Kroneld U, Jonsson R, Carlsten H, Bremell T, Johannessen AC, Tarkowski A. Expression of the mucosal lymphocyte integrin  $\alpha^E\beta_7$  and its ligand E-cadherin in salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Scand J Rheumatol* 1998; 27:215-218.
87. Ladel CH, Blum C, Dreher A, Reifenberg K, Kaufmann SH. Protective role of  $\gamma\delta$  T cells and  $\alpha\beta$  T cells in tuberculosis. *Eur J Immunol* 1995; 25:2877-2881.
88. Lafarge X, Merville P, Cazin MC, Berge F, Potaux L, Moreau JF, Dechanet-Merville J. Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating  $\gamma\delta$  T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *J Infect Dis* 2001; 184:533-541.
89. Lampugnani MG, Resnati M, Raiteri M, Pigott R, Pisacane A, Houen G, Ruco LP, Dejana E. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol* 1992; 118:1511-1522.
90. Lang R, Kocourek A, Braun M, Tschesche H, Huber R, Bode W, Maskos K. Substrate specificity determinants of human macrophage elastase (MMP-12) based on the 1.1 Å crystal structure. *J Mol Biol* 2001; 312:731-742.
91. Lanier LL, Ruitenberg JJ, Phillips JH. Human CD3<sup>+</sup> T lymphocytes that express neither CD4 nor CD8 antigens. *J Exp Med* 1986; 164:339-344.

92. Lee WL, Downey GP. Leukocyte elastase: physiological functions and role in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:896-904.
93. Li XC, Demirci G, Ferrari-Lacraz S, Groves C, Coyle A, Malek TR, Strom TB. IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo. *Nat Med* 2001; 7:114-118.
94. Lodolce J, Burkett P, Koka R, Boone D, Chien M, Chan F, Madonia M, Chai S, Ma A. Interleukin-15 and the regulation of lymphoid homeostasis. *Mol Immunol* 2002; 39:537-544
95. Lohmeyer J, Friedrich J, Grimminger F, Maus U, Tenter R, Morr H, Velcovsky HG, Seeger W, Rosseau S. Expression of mucosa-related integrin  $\alpha^E\beta_7$  on alveolar T cells in interstitial lung diseases. *Clin Exp Immunol* 1999; 116:340-346.
96. Maeurer MJ, Lotze MT. Interleukin-7 (IL-7) knockout mice. Implications for lymphopoiesis and organ-specific immunity. *Int Rev Immunol* 1998; 16:309-322.
97. McDonnell S, Morgan M, Lynch C. Role of matrix metalloproteinases in normal and disease processes. *Biochem Soc Trans* 1999; 27:734-740.
98. Moretta A, Bottino C, Ciccone E, Tambussi G, Mingari MC, Ferrini S, Casorati G, Varese P, Viale O, Migone N. Human peripheral blood lymphocytes bearing T cell receptor  $\gamma\delta$ . Expression of CD8 differentiation antigen correlates with the expression of the 55-kD, C $\gamma$ 2-encoded  $\gamma$  chain. *J Exp Med* 1988; 168:2349-2354.
99. Morita CT, Verma S, Aparicio P, Martinez C, Spits H, Brenner MB. Functionally distinct subsets of human  $\gamma\delta$  T cells. *Eur J Immunol* 1991; 21:2999-3007.
100. Munk ME, Emoto M. Functions of T-cell subsets and cytokines in mycobacterial infections. *Eur Respir J Suppl* 1995; 20:668-675.
101. Nakamura T, Matsuzaki G, Nomoto K. The protective role of T-cell receptor V $\gamma$ 1<sup>+</sup> T cells in primary infection with *Listeria monocytogenes*. *Immunology* 1999; 96:29-34.
102. Nakata M, Smyth MJ, Norihisa Y, Kawasaki A, Shinkai Y, Okumura K, Yagita H. Constitutive expression of pore-forming protein in peripheral blood  $\gamma\delta$  T cells: implication for their cytotoxic role in vivo. *J Exp Med* 1990; 172:1877-1880.
103. Nose A, Takeichi M. A novel cadherin cell adhesion molecule: its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos. *J Cell Biol* 1986; 103:2649-2658.
104. O'Brien RL, Happ MP, Dallas A, Palmer E, Kubo R, Born WK. Stimulation of a major subset of lymphocytes expressing T cell receptor  $\gamma\delta$  by an antigen derived from *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell* 1989; 57:667-674.
105. O'Brien RL, Fu YX, Cranfill R, Dallas A, Ellis C, Reardon C, Lang J, Carding SR, Kubo R, Born W. Heat shock protein Hsp60-reactive  $\gamma\delta$  cells: a large, diversified T-lymphocyte subset with highly focused specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:4348-4352.
106. Osman M, Cantor JO, Roffman S, Keller S, Turino GM, Mandl I. Cigarette smoke impairs elastin resynthesis in lungs of hamsters with elastase-induced emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132:640-643.
107. Panchamoorthy G, McLean J, Modlin RL, Morita CT, Ishikawa S, Brenner MB, Band H. A predominance of the T cell receptor V $\gamma$ 2/V $\delta$ 2 subset in human mycobacteria-responsive T cells suggests germline gene encoded recognition. *J Immunol* 1991; 147:3360-3369.
108. Parker CM, Cepek KL, Russell GJ, Shaw SK, Posnett DN, Schwarting R, Brenner MB. A family of  $\beta_7$  integrins on human mucosal lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:1924-1928.

109. Pauls K, Schon M, Kubitza RC, Homey B, Wiesenborn A, Lehmann P, Ruzicka T, Parker CM, Schon MP. Role of integrin  $\alpha^E$ (CD103) $\beta_7$  for tissue-specific epidermal localization of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *J Invest Dermatol* 2001; 117:569-575.
110. Pawankar R.  $\gamma\delta$  T cells in allergic airway diseases. *Clin Exp Allergy* 2000; 30:318-323.
111. Porcelli S, Brenner MB, Band H. Biology of the human  $\gamma\delta$  T-cell receptor. *Immunol Rev* 1991; 120:137-183.
112. Rakasz E, Mueller A, Perlman S, Lynch RG.  $\gamma\delta$  T cell response induced by vaginal Herpes simplex 2 infection. *Immunol Lett* 1999; 70:89-93.
113. Raulf M, Liebers V, Steppert C, Baur X. Increased  $\gamma\delta$ -positive T-cells in blood and bronchoalveolar lavage of patients with sarcoidosis and hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J* 1994; 7:140-147.
114. Raziuddin S, Shetty S, Ibrahim A. Phenotype, activation and lymphokine secretion by  $\gamma\delta$  T lymphocytes from schistosomiasis and carcinoma of the urinary bladder. *Eur J Immunol* 1992a; 22:309-314.
115. Raziuddin S, Telmasani AW, el-Hag el-Awad, al-Amari O, al-Janadi M.  $\gamma\delta$  T cells and the immune response in visceral leishmaniasis. *Eur J Immunol* 1992b; 22:1143-1148.
116. Rich CB, Nugent MA, Stone P, Foster JA. Elastase release of basic fibroblast growth factor in pulmonary fibroblast cultures results in down-regulation of elastin gene transcription. A role for basic fibroblast growth factor in regulating lung repair. *J Biol Chem* 1996; 271:23043-23048.
117. Richter G, Hanewinkel K, Burdach S. Differential analysis of interleukin 2 (IL-2) versus IL-15 induced immediate-early genes: A contribution for the elucidation of the AICD paradoxon? Joint annual fall meeting of GBM and DGPT 2002; DOI:10.1240/sav\_gbm\_2002\_h\_000226.
118. Robak E, Niewiadomska H, Robak T, Bartkowiak J, Blonski JZ, Wozniacka A, Pomorski L, Sysa-Jedrezejowska A. Lymphocytes T  $\gamma\delta$  in clinically normal skin and peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus and their correlation with disease activity. *Mediators Inflamm* 2001; 10:179-189.
119. Robertson H, Wong WK, Talbot D, Burt AD, Kirby JA. Tubulitis after renal transplantation: demonstration of an association between CD103<sup>+</sup> T cells, transforming growth factor  $\beta_1$  expression and rejection grade. *Transplantation* 2001a; 71:306-313.
120. Robertson H, Wong WK, Burt AD, Mohamed MA, Talbot D, Kirby JA. Relationship between TGF- $\beta_1$ , intratubular CD103 positive T cells and acute renal allograft rejection. *Transplant Proc* 2001b; 33:1159.
121. Rosenberg HF, Domachowske JB. Eosinophils, ribonucleases and host defense: solving the puzzle. *Immunol Res* 1999; 20:261-274.
122. Rostapshova EA, Burns JM, Bartlett ST, Hadley GA. Integrin-mediated interactions influence the tissue specificity of CD8<sup>+</sup> cytolytic T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1998; 28:3031-3039.
123. Saunders BM, Frank AA, Cooper AM, Orme IM. Role of  $\gamma\delta$  T cells in immunopathology of pulmonary *Mycobacterium avium* infection in mice. *Infect Immun* 1998; 66:5508-5514.
124. Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K. Anatomie. 6. Aufl. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1995a, pp. 164-167.
125. Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K. Anatomie. 6. Aufl. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1995b, pp. 177-179.
126. Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K. Anatomie. 6. Aufl. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1995c, p. 56.



127. Schon MP, Arya A, Murphy EA, Adams CM, Strauch UG, Agace WW, Marsal J, Donohue JP, Her H, Beier DR, Olson S, Lefrancois L, Brenner MB, Grusby MJ, Parker CM. Mucosal T lymphocyte numbers are selectively reduced in integrin  $\alpha^E$ (CD103)-deficient mice. *J Immunol* 1999; 162:6641-6649.
128. Schwarz M, Brett J, Li J, Hayward J, Schwarz R, Kao J, Chappey O, Wautier JL, Chabot J, Lo Gerfo P, Stern D. Endothelial-monocyte activating polypeptide (EMAP) II, a novel antiangiogenic protein, suppresses tumor growth and induces apoptosis in endothelial cells. *Circulation* 1995; 92:7.
129. Schwarz MA, Zhang F, Gebb S, Starnes V, Warburton D. Endothelial monocyte activating polypeptide II inhibits lung neovascularization and airway epithelial morphogenesis. *Mech Dev* 2000; 95:123-132.
130. Sciammas R, Bluestone JA. TCR  $\gamma\delta$  cells and viruses. *Microbes Infect* 1999; 1:203-212.
131. Scott CS, Richards SJ, Roberts BE. Patterns of membrane TCR  $\alpha\beta$  and TCR  $\gamma\delta$  chain expression by normal blood CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8dim<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> lymphocytes. *Immunology* 1990; 70:351-356.
132. Shimoyama Y, Hirohashi S, Hirano S, Noguchi M, Shimosato Y, Takeichi M, Abe O. Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. *Cancer Res* 1989; 49:2128-2133.
133. Skelsey ME, Mellon J, Niederkorn JY.  $\gamma\delta$  T cells are needed for ocular immune privilege and corneal graft survival. *J Immunol* 2001; 166:4327-4333.
134. Smith TJ, Ducharme LA, Shaw SK, Parker CM, Brenner MB, Kilshaw PJ, Weis JH. Murine M290 integrin expression modulated by mast cell activation. *Immunity* 1994; 1:393-403.
135. Spits H, Paliard X, Vandekerckhove Y, van Vlasselaer P, de Vries JE. Functional and phenotypic differences between CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>-</sup> T cell receptor  $\gamma\delta$  clones from peripheral blood. *J Immunol* 1991; 147:1180-1188.
136. Starke K. Grundlagen der Pharmakologie des Nervensystems. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 7. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996, pp. 125-126.
137. Steele CR, Oppenheim DE, Hayday AC.  $\gamma\delta$  T cells: non-classical ligands for non-classical cells. *Curr Biol* 2000; 10:282-285.
138. Stemme S, Rymo L, Hansson GK. Polyclonal origin of T lymphocytes in human atherosclerotic plaques. *Lab Invest* 1991; 65:654-660.
139. Stone PJ, Morris SM, Thomas KM, Schuhwerk K, Mitchelson A. Repair of elastase-digested elastic fibers in acellular matrices by replating with neonatal rat-lung lipid interstitial fibroblasts or other elastogenic cell types. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17:289-301.
140. Strauch UG, Mueller RC, Li XY, Cernadas M, Higgins JM, Binion DG, Parker CM. Integrin  $\alpha^E$ (CD103) $\beta_7$  mediates adhesion to intestinal microvascular endothelial cell lines via an E-cadherin-independent interaction. *J Immunol* 2001; 166:3506-3514.
141. Strauss WM, Quertermous T, Seidman JG. Measuring the human T cell receptor  $\gamma$ -chain locus. *Science* 1987; 237:1217-1219.
142. Strieter RM. Con: Inflammatory mechanisms are not a minor component of the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:1206-1207.
143. Suzuki J, Morimoto S, Amano H, Tokano Y, Takasaki Y, Hashimoto H. Serum levels of interleukin 15 in patients with rheumatic diseases. *J Rheumatol* 2001; 28:2389-2391.

144. Suzuki Y, Fujimiya Y, Ohno T, Katakura R, Yoshimoto T. Enhancing effect of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , but not IFN- $\gamma$ , on the tumor-specific cytotoxicity of  $\gamma\delta$  T cells from glioblastoma patients. *Cancer Lett* 1999; 140:161-167.
145. Sweet MJ, Hume DA. CSF-1 as a regulator of macrophage activation and immune responses. *Arch Immunol Ther Exp* 2003; 51:169-177.
146. Takahashi H, Nukiwa T, Basset P, Crystal RG. Myelomonocytic cell lineage expression of the neutrophil elastase gene. *J Biol Chem* 1988; 263:2543-2547.
147. Takeichi M. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem* 1990; 59:237-252.
148. Takeichi M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7:619-627.
149. Takeuchi K, Hirata N, Ukai K, Sakakura Y. Analysis of  $\gamma\delta$  T-cell receptor repertoire in the human nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99:251-253.
150. Tang A, Amagai M, Granger LG, Stanley JR, Udey MC. Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature* 1993; 361:82-85.
151. Taooka Y, Maeda A, Hiyama K, Ishioka S, Yamakido M. Effects of neutrophil elastase inhibitor on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:260-265.
152. Taraszka KS, Higgins JM, Tan K, Mandelbrot DA, Wang JH, Brenner MB. Molecular basis for leukocyte integrin  $\alpha^E\beta_7$  adhesion to epithelial (E)-cadherin. *J Exp Med* 2000; 191:1555-1567.
153. Tas MP, Murray JC. Endothelial-monocyte-activating polypeptide II. *Int J Biochem Cell Biol* 1996; 28:837-841.
154. Terpe HJ, Tajrobehkar K, Gunthert U, Altmannsberger M. Expression of cell adhesion molecules  $\alpha_2$ ,  $\alpha_5$  and  $\alpha_6$  integrin, E-cadherin, N-CAM and CD-44 in renal cell carcinomas. An immunohistochemical study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1993; 422:219-224.
155. Tiisala S, Paavonen T, Renkonen R.  $\alpha^E\beta_7$  and  $\alpha_4\beta_7$  integrins associated with intraepithelial and mucosal homing, are expressed on macrophages. *Eur J Immunol* 1995; 25:411-417.
156. Tkalcovic J, Novelli M, Phylactides M, Iredale JP, Segal AW, Roes J. Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G. *Immunity* 2000; 12:201-210.
157. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983; 302:575-581.
158. Uh ST, Ki SY, Lim GI, Moon SH, Jeong SW, Kim HT, Park CS. The T cell receptor subsets of lymphocytes in bronchoalveolar lavage in patients with active pulmonary tuberculosis. *Respir Med* 1998; 92:408-414.
159. Utsumi K, Kawanishi K, Kuriyama Y, Nakano M, Ichinose Y, Toyama K.  $\gamma\delta$  T cells in peripheral blood and in bronchoalveolar lavage fluid from patients with sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 1995; 33:1186-1190.
160. Vaessen LMB, Ouwehand AJ, Baan CC, Jutte NHPM, Balk AHMM, Claas FHJ, Weimar W. Phenotypic and functional analysis of T cell receptor  $\gamma\delta$ -bearing cells isolated from human heart allografts. *J Immunol* 1991; 147:846-850.
161. Villarrubia N, Leon F, Bootello A. T  $\gamma\delta$  lymphocytes and their role in hypersensitivity processes in the digestive and respiratory mucosa. *Allergol Immunopathol* 2002; 30:273-282.

162. Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 2000; 14:2123-2133.
163. Warburton D, Schwarz M, Tefft D, Flores-Delgado G, Anderson KD, Cardoso WV. The molecular basis of lung morphogenesis. *Mech Dev* 2000; 92:55-81.
164. Wilde DB, Roberts K, Sturmhofel K, Kikuchi G, Coligan JE, Shevach EM. Mouse autoreactive  $\gamma\delta$  T cells. I. Functional properties of autoreactive T cell hybridomas. *Eur J Immunol* 1992; 22:483-489.
165. Wilsher ML, Hallowes M, Birchall NM.  $\gamma\delta$  cells in tissue from patients with sarcoidosis. *Thorax* 1996; 51:1123-1126.
166. Wingren C, Crowley MP, Degano M, Chien Y, Wilson IA. Crystal structure of a  $\gamma\delta$  T cell receptor ligand T22: a truncated MHC-like fold. *Science* 2000; 287:310-314.
167. Workalemahu G, Braun RK, Förster M, Kroegel C. Regulation des  $\alpha^F\beta_7$  Integrins auf lymphoblastischen Leukemia T-Zellen. Vergleich mit humanen  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten. *Pneumologie* 2001; 55:S95.
168. Ye SK, Maki K, Lee HC, Ito A, Kawai K, Suzuki H, Mak TW, Chien Y, Honjo T, Ikuta K. Differential roles of cytokine receptors in the development of epidermal  $\gamma\delta$  T cells. *J Immunol* 2001; 167:1929-1934.
169. Ying S, Meng Q, Kay AB, Robinson DS. Elevated expression of interleukin-9 mRNA in the bronchial mucosa of atopic asthmatics and allergen-induced cutaneous late-phase reaction: relationships to eosinophils, mast cells and T lymphocytes. *Clin Exp Allergy* 2002; 32:866-871.
170. Zheng BJ, Chan KW, Im S, Chua D, Sham JS, Tin PC, He ZM, Ng MH. Anti-tumor effects of human peripheral  $\gamma\delta$  T cells in a mouse tumor model. *Int J Cancer* 2001; 92:421-425.
171. Ziora D, Mazur B, Grzanka P, Niepsuj G, Oklek K. BAL from two different lung segments indicated by high resolution computed tomography (HRCT) in patients with sarcoidosis. II. The role of T  $\gamma\delta$  lymphocytes. *Pneumonol Alergol Pol* 1999; 67:435-442.
172. Zissel G, Baumer I, Schlaak M, Muller-Quernheim J. In vitro release of interleukin-15 by broncho-alveolar lavage cells and peripheral blood mononuclear cells from patients with different lung diseases. *Eur Cytokine Netw* 2000; 11:105-112.

## Veröffentlichungen

- Kämena A, Braun RK, Förster M, Gardina P, Zaune A, Kühl M, Kroegel C. Expression des epithelialen „Homing-Rezeptors“  $\alpha^E\beta_7$  auf humanen  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten nach Zytokinstimulation. *Pneumologie* 2000; 54:S87. (Posterpräsentation auf dem 41. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie im März 2000 in Hamburg)
- Kaemena A, Braun RK, Foerster M, Zaune A, Kuehl M, Gardina P, Grahmann PR, Kroegel C. Regulation of the epithelial „homing receptor“  $\alpha^E\beta_7$  expression on human  $\gamma\delta$  T-lymphocytes by IL-2 and IL-15. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:A20. (Vortrag auf der ‘96<sup>th</sup> International Conference’ der ‘American Thoracic Society’, im Mai 2000 in Toronto, Kanada)
- Kämena A, Braun RK, Förster M, Kühl M, Kroegel C. Proliferationsverhalten von  $\alpha^E\beta_7$  (CD103) exprimierenden humanen  $\gamma\delta$  T-Zellen. *Pneumologie* 2001; 55:S30. (Vortrag auf dem 42. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie im März 2001 in Jena)
- Kaemena A, Braun RK, Foerster M, Kuehl M, Kroegel C. Proliferation of human  $\gamma\delta$  T-cells expressing the epithelial “homing receptor”  $\alpha^E\beta_7$  (CD103). *American Thoracic Society* 2001; 163:A600. (Posterpräsentation auf der ‘97<sup>th</sup> International Conference’ der ‘American Thoracic Society’, im Mai 2001 in San Francisco, U.S.A.)
- Kaemena A, Knollmann F, Schröder R, Lehmkuhl L, Warschewske G, Boack W, Haas N, Felix R. Erstversorgung polytraumatisierter Patienten mittels CT: Zusatznutzen des Achtzeilendetektors im Vergleich zum Vierzeilen-CT. *Fortschr Röntgenstr* 2003; 175:S294. (Posterpräsentation auf dem 84. Deutschen Röntgenkongress im Mai 2003 in Wiesbaden)
- Kämena A, Beyersdorff F, Neumann F, Lehmkuhl L, Gaffke G, Teichgräber U, Bruhn H, Felix R. Can MR imaging of the prostate at 3.0-T with phased-array coil compete with a combined phased-array/endorectal coil approach at 1.5-T? (Vortrag auf dem ‘2<sup>nd</sup> International Symposium on Highfield MR in Clinical Applications’ im September 2003 in Bonn)
- Kühl M, Förster M, Braun RK, Zaune A, Kämena A, Kroegel C. Expression von Aminopeptidase-N, Fc- $\gamma$ RII Rezeptor und Adhensionsmolekülen auf humanen eosinophilen Granulozyten. Modulation durch Montelukast. *Pneumologie* 2000; 54:S84. (Posterpräsentation auf dem 41. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie im März 2000 in Hamburg)
- Zaune A, Förster M, Häfner C, Kühl M, Kämena A, Gardina P, Braun RK, Kroegel C. Regulation der CD95-Expression humaner eosinophiler Granulozyten durch Dexamethason. Einfluss auf die zelluläre Viabilität. *Pneumologie* 2000; 54:S84. (Posterpräsentation auf dem 41. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie im März 2000 in Hamburg)
- Zaune A, Foerster M, Braun RK, Kaemena A, Kuehl M, Haefner D, Kroegel C. Modulation of cytokine-induced expression of CD69 and CD95 of human eosinophils by cicaprost. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:A337. (Posterpräsentation auf der ‘96<sup>th</sup> International Conference’ der ‘American Thoracic Society’, im Mai 2000 in Toronto, Kanada)

**Curriculum vitae**

Name:	Andreas Kämena
Anschrift:	Lohnbachstr. 29, 38690 Vienenburg
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Geburtsdatum:	05.05.1975
Geburtsort:	Goslar
1981 – 1985	Grundschule Immenrode
1985 – 1987	Orientierungsstufe „Goldene Aue“ Goslar
1987 – 1994	Christian-von-Dohm-Gymnasium Goslar
07 / 94	Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife (Abitur)
10 / 94 – 09 / 95	Wehrdienst beim 4. / Raketenartilleriebataillon 12 in Nienburg
10 / 95 – 04 / 02	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
04 / 02	Erteilung der Erlaubnis für die Tätigkeit als Arzt im Praktikum
04 / 00 – 09 / 01	Fernstudium Praktische Informatik „Datenbanksysteme“ an der Technischen Fachhochschule Berlin, erfolgreicher Abschluss
seit 08 / 02	Arzt im Praktikum an der Klinik für Strahlenheilkunde, Charité – Campus Virchow-Klinikum, Berlin (Direktor: Prof. Dr. Dr. R. Felix)
seit 1998	Promotion in der Abteilung für Pneumologie & Allergologie / Immunologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Thema: Expression des $\alpha^E\beta_7$ -Antigens auf humanen $\gamma\delta$ T-Lymphozyten. Regulation der $\alpha^E\beta_7$ -Expression auf humanen $\gamma\delta$ T-Zellen und die Bedeutung des $\alpha^E\beta_7$ -Phänotyps für die Zellfunktion.

Berlin, den 8. Dezember 2003

Andreas Kämena

## ***Danksagung***

Die experimentelle Grundlage der vorliegenden Arbeit wurde zwischen den Jahren 1998 und 2002 im Forschungslabor der Abteilung für Pneumologie & Allergologie / Immunologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena erarbeitet.

Mein ganz besonderer Dank gilt zunächst meinem wissenschaftlichen und klinischen Lehrer Herrn Prof. Dr. Dr. C. Kroegel für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas und für seine weitreichende und anhaltende Unterstützung meiner klinischen und wissenschaftlichen Laufbahn. Eine ausgezeichnete wissenschaftliche Anleitung und eine stets vertrauensvolle Atmosphäre waren die Grundlage für eine äußerst angenehme Zusammenarbeit.

Darüber hinaus danke ich Herrn Dr. R. Braun, Herrn Dipl.-Biol. M. Förster und Herrn Dr. G. Workalemahu für ihre zahlreichen Diskussionen und Anregungen im Laufe der Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit. Sie hatten jederzeit ein offenes Ohr für Fragen und Probleme und ermutigten mich auf dem oft mühsamen Weg der Ergebnisfindung.

Mein Dank gilt ferner den verschiedenen wissenschaftlichen Mitarbeitern und Medizinisch-Technischen Assistentinnen des Pneumologischen Forschungslabors, welche mir bei der technischen Durchführung der Experimente stets mit Rat und Tat hilfreich zur Seite standen.

Nicht zuletzt danke ich auch meinen Eltern, die mir meine Ausbildung und die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglichten.

***Ehrenwörtliche Erklärung***

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Prof. Dr. Dr. C. Kroegel, Herr Dr. R. Braun, Herr Dipl.-Biol. M Förster und Herr Dr. G. Workalemahu,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Berlin, den 8. Dezember 2003

Andreas Kämena